

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie



Železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů I.

Iron-chelating activity of selected alkaloids I.

(diplomová práce)

Vypracovala: Tereza Rudolfová

Školitel: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Akademický rok 2012-2013

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Tereza Rudolfová**

studijní program: **Farmacie**

studijní obor: **Farmacie**

Děkan fakulty Vám podle zákona č. 111/1998 Sb. určuje tuto diplomovou práci:

Název práce: **Železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů I.**

Anglický název práce: **Iron-chelating activity of selected alkaloids I.**

Zásady pro vypracování:

- 1) zpracování literární rešerše
- 2) výběr vhodných alkaloidů různých struktur
- 3) stanovení železo-chelatační aktivity jednotlivých alkaloidů v roztoku
- 4) určení vztahu mezi aktivitou a strukturou
- 5) sepsání práce

Seznam odborné literatury:

Internetové databáze Chemical Abstracts (provedení základní rešerše), originální periodika podle výsledků vzešlých při provádění rešerše v Chemical Abstracts (Planta Medica, Phytochemistry, apod.). Obecné příručky použité pro zpracování úvodní části, resp. pro popis jednotlivých alkaloidů a jejich použití.

Stokey Lawrence L. Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. Anal Chem 1970;42(7),779 - 781


Vedoucí diplomové práce: **Ing. Macáková Kateřina**

Oponenti:

Konzultanti:

Datum zadání diplomové práce: 25.11.2011

Termín odevzdání diplomové práce: dle harmonogramu příslušného akademického roku


.....
Vedoucí katedry


.....
Děkan

V Hr. Králové 09.12.2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové

Tereza Rudolfová

1 Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Kateřině Macákové Ph.D., školitelce diplomové práce, za vedení práce, poskytnuté materiály, pomoc při měření v laboratoři, řešení a zpracovávání diplomové práce. Děkuji také Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. a jejím spolupracovníkům za poskytnutí většiny alkaloidů pro mou práci. Zároveň bych také samozřejmě chtěla poděkovat celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí zázemí pro provedení experimentální části diplomové práce. Pracovníkům katedry organické a anorganické chemie a PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. bych ráda poděkovala za pomoc s řešením problému účinnosti alkaloidů při úpravě pH. Tento výstup vznikl za podpory projektu SVV (2013) č. 267002.

2 Obsah

1	Poděkování	6
3	Úvod	9
4	Cíl práce.....	11
5	Teoretická část	12
5.1	Železo a jeho funkce v organismu	12
5.2	Patologie železa	13
5.2.1	Nedostatek železa	13
5.2.2	Nadbytek železa.....	13
5.2.3	Léčba hematochromatózy a akutní intoxikace železem	17
5.3	Chelátotvorné látky	17
5.3.1	Deferoxamin	18
5.4	Alkaloidy.....	19
5.4.1	Isochinolinové alkaloidy.....	20
6	Praktická část	29
6.1	Materiál	29
6.2	Chemikálie	29
6.3	Přístrojové vybavení	29
6.4	Testované látky	29
6.5	Metody	30
6.5.1	Příprava zásobních roztoků	30
6.5.2	Zkoušky roztoků iontů.....	31
6.5.3	Kalibrace železnatých iontů.....	31
6.5.4	Chelatace železnatých iontů	32
6.5.5	Chelatace celkového železa	33
6.6	Vyhodnocení výsledků.....	34
6.7	Výsledky	35

6.7.1	Kalibrační křivka pro Fe^{2+} ionty	35
6.8	Chelatační aktivita jednotlivých alkaloidů.....	36
7	Diskuze	46
8	Závěr.....	49
9	Seznam zkratek.....	50
10	Citovaná literatura	51
11	Abstrakt	57
12	Abstract.....	59

3 Úvod

Přechodné kovy, mezi nimi hlavně železo, jsou nezbytnou součástí organismu. Řadí se mezi tzv. stopové prvky, ty jsou pro organismus esenciální, ale denní příjem nepřesahuje 20mg, u některých (chrom) denní potřeba nedosahuje ani 0,2 mg. Kromě železa se do této skupiny řadí také zinek, kobalt, mangan, měď, chrom a další. Většina z nich má úlohu jako kofaktory enzymů, zinek se uplatňuje ve více než 300 enzymech, měď je součástí velkého množství oxidáz (monoaminoxidáza, superoxiddismutáza). Železo, kterému je věnována tato práce, hraje svoji nedílnou úlohu v procesu zásobování organismu kyslíkem, při kterém se železo účastní jako nezbytná součást molekuly hemu v erytrocytech. Jako součást myoglobinu zajišťuje okysličování svalů, je nezbytné pro funkci cytochromů a Fe-S komplexů (1).

Stejně jako u procentuálně více zastoupených součástí organismu, vybočení z rovnováhy u stopových prvků s sebou nese zdravotní komplikace. Nedostatek železa se projevuje anémií. Nejčastější příčinou anémie jsou poruchy metabolismu železa nebo velké krevní ztráty. Anémie z nedostatečného příjmu železa v potravě se už vyskytuje pouze v zemích třetího světa. Nadbytek železa není tak častý, vyskytuje se jako dědičné onemocnění hemochromatóza nebo je způsoben častými krevními transfuzemi (např. při léčbě thalasémie). Podle nových poznatků výzkumu se vyskytují zvýšené hladiny volného železa a dalších přechodných prvků také u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (2).

Alzheimerova choroba se stává stále větší hrozbou mezi starší populací. Vzhledem ke stárnutí populace trpí tímto onemocněním stále větší počet lidí. V USA je podle výzkumu Alzheimerova nemoc šestou nejčastější příčinou smrti mezi lidmi staršími 65-ti let. Nemoc se řadí mezi demence s progresivním průběhem. V současné době není nemoc dostupnými prostředky léčitelná a je tedy ukončena smrtí nemocného. Známá léčiva dokážou průběh nemoci zpomalit nebo oddálit nástup těžších stádií. Mezi nejčastěji používaná léčiva patří inhibitory acetylcholinesterázy jako galantamin, donepezil, a rivastigmin. V těžších stádiích jsou používány inhibitory NMDA receptorů, mezi které patří memantin, případně by měly být oba typy léčiv používány současně (3). U pacientů trpících Alzheimerovou chorobou byly zjištěny zvýšené koncentrace přechodných kovů (Fe, Cu...) v mozku, které podporují vznik volných radikálů (2). Především hojně

vznikající hydroxylový radikál je příčinou dalšího poškození neuronů a jejich zvýšené buněčné smrti, čímž je způsobeno další zhoršení funkcí mozku.

Mezi známé chelátory železa patří deferoxamin (DFX). Léčba jím je však velice časově i finančně náročná, což způsobuje vysokou non-compliantnost pacientů. DFX je nutné podávat intravenózně po dobu 8-12 hodin denně po 5-7 dní v týdnu. Mezi nežádoucí účinky patří neurotoxicita a poruchy chrupavky. Z těchto důvodů se hledají nové látky schopné snižovat hladiny volného železa v těle. Z tohoto důvodu se tato diplomová práce zabývá zjištěním železo-chelatační aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů (allokryptopin, berberin, bulbokapnin, eschscholtzin, galantin, lykorin, kalifornidin, protopin, sinoakutin, skulerin, stylopin). Vzorek DFX byl použit jako standart pro srovnání účinnosti.

4 Cíl práce

Cílem diplomové práce je:

- změřit železo-chelatační aktivitu vybraných alkaloidů bez úpravy pH. Mezi vybrané patří zástupci isochinolinového typu alkaloidů: allokryptopin, berberin, bulbokapnin, eschscholtzin, galantin, lykorin, kalifornidin, protopin, sinoakutin, skulerin, stylopin
- změřit železo-chelatační aktivitu stejných vybraných alkaloidů při úpravě pH. Hodnoty při upraveném pH připraveném pomocí pufrů se stanoví při pH 4,5, 5,5, 6,8 a 7,5
- porovnat aktivitu alkaloidů navzájem a ve srovnání s deferoxaminem. Určit vliv struktury alkaloidů na železo-chelatační aktivitu

5 Teoretická část

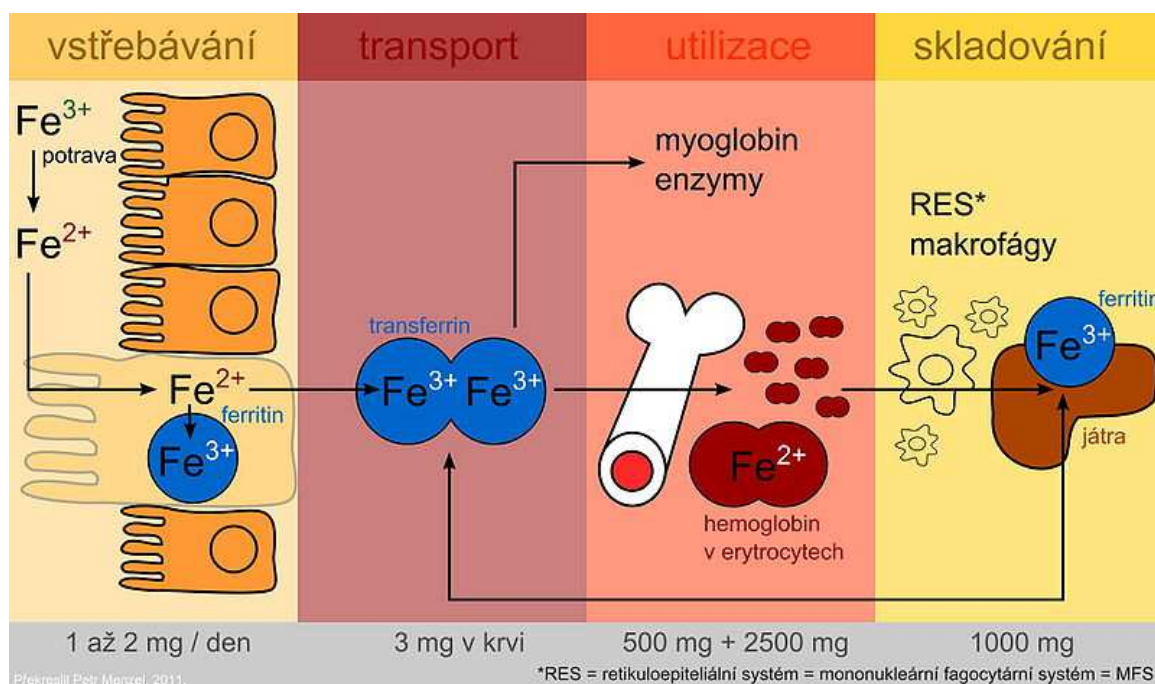
5.1 Železo a jeho funkce v organismu

Železo patří mezi stopové prvky nacházející se v lidském těle. V organismu se nachází v poměrně velkém množství celkově odpovídající asi 4-5 gramům. Více než 70 procent se nachází v hematoproteinech, mezi které patří hemoglobin (66 %), myoglobin (6 %) a v hemových enzymech (1 %). Zbylá procenta připadají na železo vázané na transportní a zásobní proteiny, především transferin a feritin (Obr. 1). Hladina železa v tělních tekutinách se udržuje na hodnotách pod 10^{-10} mol.l⁻¹. Vyšší hodnoty mohou na organismus působit toxicky.

Hladina železa v těle je ovlivněna množstvím přijatým z potravy. Potřeba příjmu se liší podle pohlaví. Odpovídá asi 10 mg u mužů a 15 mg u žen v reprodukčním věku, u kterých dochází ke zvýšeným ztrátám menstruací. Z potravy se vstřebává pouze železo ve formě Fe²⁺ iontů, Fe³⁺ ionty jsou na střevní sliznici redukovány pomocí ferireduktázy na vstřebatelnou formu. V enterocytech se železnaté ionty váží na transportní protein feritin, který zajistí transport do krve. V krevním řečišti dochází opět k oxidaci a následné vazbě na transportní protein transferin. V jiných tělních tekutinách se nachází proteiny pro vazbu železa, souhrnně se nazývají laktoferiny.

Většina železa v organismu je využita k tvorbě červených krvinek v kostní dřeni, kde je zabudováno do hemoglobinu. Takto jsou zabudovány asi 2,5-3 g železa. Nadbytečné železo je skladováno pomocí proteinu feritinu v játrech, slezině a kostní dřeni. Další protein umožňující skladování železa je hemosiderin, který ale neumožňuje rychlou mobilizaci zásob.

Vylučování železa je realizováno žlučí, kde se železo vylučuje vázané na bilirubin z rozloženého hemoglobinu z červených krvinek. Takto vázané hemové železo je ale z velké části zpětně resorbováno. Dále dochází k vylučování železa v malé míře odlupem buněk střevní sliznice a krvácením(1).



Obrázek 1: Distribuce železa v organismu. (4)

5.2 Patologie železa

5.2.1 Nedostatek železa

Jeden z projevů nedostatku železa v organismu je hypochromní mikrocytární anémie, která je způsobena nedostatečným příjmem železa. Hladiny sérového feritinu jsou pod hodnotou 0,4 mg/l, v důsledku toho dochází k snížené tvorbě hemoglobinu. Mezi hlavní příčiny nedostatku železa patří ztráty krve, které mohou být nejčastěji způsobeny silným menstruačním krvácením nebo krvácením do GIT. Porucha zpětného vstřebávání železa vyskytující se nejčastěji u chronických infekcí je druhou nejčastější příčinou anémie. Dále může být nedostatek železa způsoben nedostatečnou výživou typickou především pro země třetího světa nebo poruchou vstřebávání způsobenou achlorhydrií nebo malabsorpcí v horních oddílech střeva. Zvýšenou potřebu železa vyžaduje samozřejmě růst, těhotenství a laktace (5).

5.2.2 Nadbytek železa

Chronický nadbytek železa nazývaný jako hematochromatóza, může být způsoben dědičnou chorobou nebo má sekundární příčinu. V obou případech dochází k nadměrnému hromadění železa v játrech, slinivce a myokardu a jejich následnému poškození. Játra jsou postižena ve většině případů, dochází u nich ke zvětšení a postupně

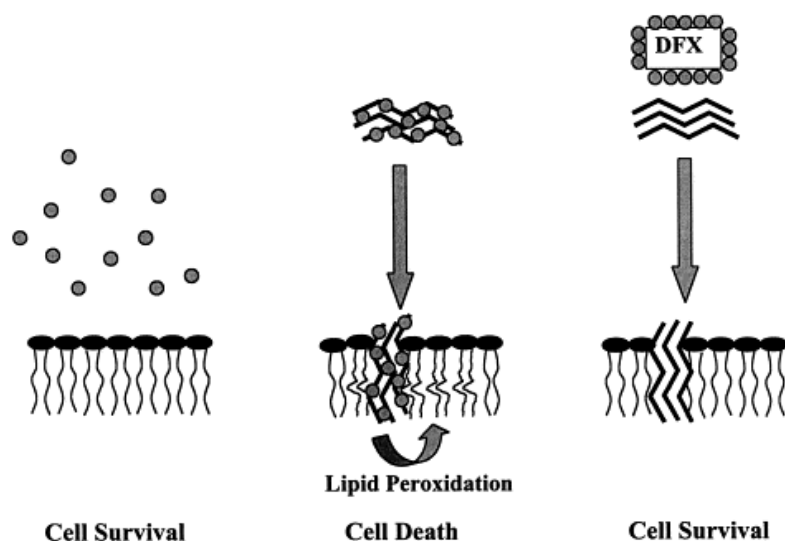
také k fibrotizaci až cirhóze. U srdce dochází ke snížení ejekční frakce, městnavému srdečnímu selhání a arytmiím. V pankreatických ostrůvcích slinivky dochází ukládáním nadbytečného železa k jejich destrukci a vyvíjí se diabetes 1. typu. Mezi další následky patří poškození hypofýzy a artropatie, která se nejčastěji vyskytuje především u metatarzálních kloubů a je nezávislá na množství naakumulovaného železa (6). Nadbytek železa také nahrává některým patologickým bakteriím, které ho potřebují k množení. Při normální hladině železa je „ukryto“ pomocí neutrofilů, při jeho nadbytku dojde ale k nasycení a železo je k dispozici bakteriím. Zvýšené množství volného železa působí také prooxidačně. V buňkách vznikají volné radikály, které je pak poškozují a urychlují jejich stárnutí (7). Následkem působení na DNA, vznikem oxidačního stresu v buňce a vyvolané buněčné smrti se zvyšuje četnost neurodegenerativních poruch (Alzheimerova demence, Parkinsonova a Creutzfeldt-Jakobova nemoc), vzniku rakoviny a onemocnění kardiovaskulárního systému (především infarkt a mrtvice) (8, 9). Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) patří hydroxylový radikál ($\text{OH}\bullet$), peroxid vodíku (H_2O_2) a superoxid ($\text{O}_2\bullet$), dále vznikají reaktivní formy dusíku (RNS) mezi nimi je nejdůležitější oxid dusnatý ($\text{NO}\bullet$) a peroxynitrit (ONOO-). Superoxid a peroxid vodíku působí na IRPs (Iron Regulatory Proteins), které zajišťují vstřebávání železa při jeho depleci tak, že dochází k zvýšenému příjmu, aniž by byla zásoba železa snížena. Tím dochází k dalšímu zvýšení volného železa a uzavření pomyslného kruhu (10). Volné radikály způsobují také poškození proteinů, lipidů a buněčných struktur jako jsou membrány mitochondrií a sarkoplazmatického retikula (11).

5.2.2.1 Alzheimerova choroba

Mezi neurodegenerativní poruchy patří Alzheimerova demence (AD). Jedná se o onemocnění šedé kůry mozkové. Nejčastěji se vyskytuje u pacientů starších 65-ti let, pokud se nemoc objeví v mladším věku, jde pravděpodobně o familiárně děděnou poruchu. Výzkum v USA označil Alzheimerovu nemoc jako šestou nejčastější příčinou smrti u lidí nad 65 let (12). Nemoc postihuje především krátkodobou paměť a schopnost rozpoznávání. Oba symptomy během doby onemocnění progredují, čímž pacienty vyřazují z normálního života, stávají se dezorientovanými a neschopnými se dorozumět s okolním světem. Onemocnění průměrně trvá od pěti do patnácti let a končí smrtí. Rozeznáváme tři stadia mírné, střední a hluboké. Začátek nemoci je pozvolný a nenápadný, v posledním stadiu dochází ke snížení aktivity, úplné izolaci. Mozek

nemocných je atrofován, to se projevuje především ve frontálním a temporálním laloku. Dochází k rozšíření gyrů a ztrátě parenchymu (13, 14, 5). Vznikají patologické nerozpustné proteiny β -amyloid, protein tau a apolipoprotein E, proteiny se spojují ve vlákna a vytváří takzvané senilní plaky. Usazují se na myelinu, který narušují a deformují axony a dendrity neuronů. V pokročilejších stádiích nemoci dochází v oblasti plaků k zvýšenému uvolňování excitačních aminokyselin (AMK) glutamátu a aspartátu. Excitační AMK ve zvýšené míře aktivují NMDA receptor (N-methyl-D-aspartát). Aktivace způsobí zvýšený influx Ca^{2+} iontů do neuronů, který v důsledku zvýší expresi genu pro zvýšenou apoptózu neuronů (3). Vlákna β -amyloidu mohou také reagovat s receptory RAGE (receptor for advanced glycation end products) a RAR (retinoic acid receptor) na povrchu buněk, které následně tvoří volné radikály. Oxidativní poškození vyskytující se u Alzheimerovy nemoci se objevuje na všech typech molekul. Molekuly sacharidů jsou glykovány, proteiny karboxylovány a nitrovány, lipidy jsou modifikovány na hydroxynonenal a akrolein a z nukleových kyselin vzniká 8-hydroxyguanosin (2). Dochází ke zvýšení buněčné smrti a stimulací mikrogliových buněk dochází k tvorbě NO, prostaglandinů, cytokinů a tím ke vzniku chronického zánětu ničícího další neurony. U Alzheimerovy nemoci byly zjištěny zvýšené hladiny přechodných kovů jako je železo nebo měď, které se akumulují především v cytoplazmě mozkových buněk a v senilních placích. Železo se ve zvýšené míře uvolňuje z hemu. Redoxně aktivní kovy se podílejí na oxidačním poškození buněk katalýzou vzniku OH radikálů (2). β -amyloid reaguje s přechodnými kovy, které zprostředkovávají jeho toxicitu. Kovy se na protein naváží a ten je poté zanesen do buněčných membrán, kde katalyzují oxidační reakce jako lipidovou peroxidaci a tím neurony ničí (Obr. 2) (15). Zánikem neuronů dochází také ke snížení množství neurotransmiterů v mozku. To se týká především acetylcholinu (ACh), u kterého dochází ke snížení koncentrace až o 90 %. To je způsobeno vymizením enzymu cholinacetyl transferázy, který je pro tvorbu ACh klíčový. Nedostatek ACh je léčen pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE), enzymu, který neurotransmiter rozkládá, a tak se zvýší dostupnost ACh na cholinergních synapsích. Mezi používané AChE inhibitory patří physostigmin, rivastigmin, donepezil, tacrin, galantamin a heptylphysostigmin. Jejich nevýhodou je neselektivní účinek a s tím spojené cholinergní nežádoucí účinky a úzké terapeutické rozmezí. Mezi další látky inhibující AChE patří také benzyloisochinolinové alkaloidy, které byly zkoumány v této práci (16, 17, 18, 19). Pro těžší stadia nemoci se používají inhibitory NMDA receptorů, které brání apoptóze

neuronů. Mezi tyto látky patří memantin. Látka má vzácné nežádoucí účinky a lze ji kombinovat s inhibitory AChE (3).



Obrázek 2: β -amyloidem zprostředkovaná peroxidace lipidů, zachycení Fe chelátorem (deferoxamin) (15)

5.2.2.2 Dědičná hematochromatóza

Dědičná hematochromatóza je specifikována vstřebáváním nadměrného množství železa. Defekt je způsoben dědičnou mutací genu na 6. chromozomu označovaného jako gen pro hematochromatózu. Sekundární příčinou zvýšeného množství železa v organismu může být nadměrné užívání alkoholu, nadměrný příjem v potravě, časté krevní transfuze a zvýšený příjem vitamínu C, který zlepšuje vstřebávání železa (20).

5.2.2.3 Akutní intoxikace železem

Akutní intoxikace železem se projevuje především po podání velké dávky železa per os a to až u 20 % pacientů. Při intramuskulárním podávání se projevy intoxikace neobjevují tak často a nejsou tak silné, proto by se mělo této formě dávat přednost. Mezi popsané projevy perorální intoxikace železem patří žaludeční a střevní potíže, jako bolest břicha dyspepsie, zácpa, černá stolice a ve vážných případech může dojít až ke krvácející gastroenteritidě, metabolické acidóze a smrti. Při parenterální intoxikaci jsou projevy intoxikace odlišné, patří mezi ně bolest hlavy, pocity horka, bolest u srdce, zvracení nevolnost a kolaps (21).

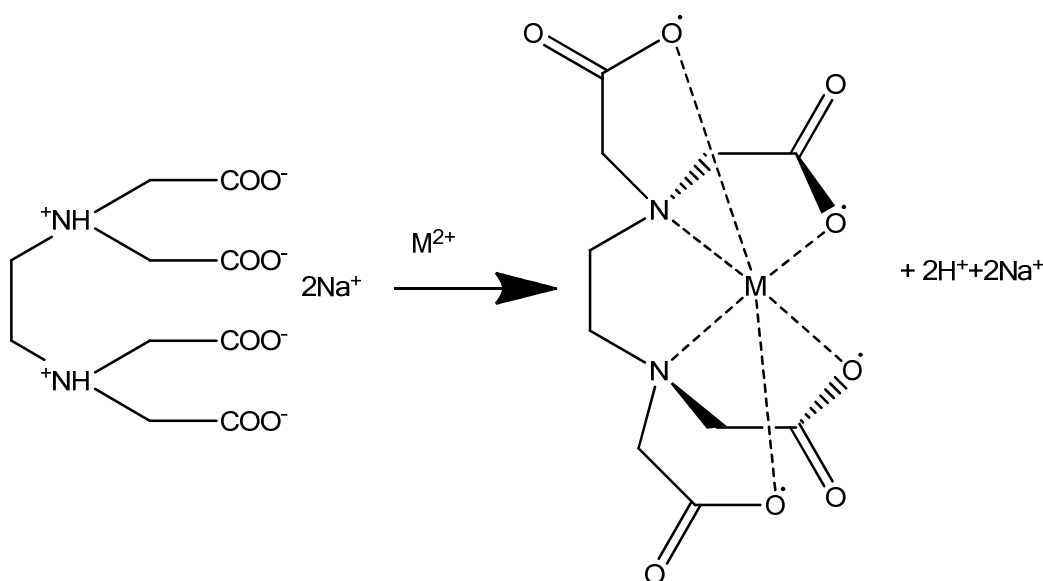
5.2.3 Léčba hematochromatózy a akutní intoxikace železem

V léčbě nadbytku železa se velmi často využívá schopnosti určitých látek nadbytečné železo navázat. Podstatou terapie je důkladný výplach žaludku a laváž fosfátovými (karbonátovými) roztoky, které s železem tvoří nevstřebatelné komplexy. Následuje podání deferoxaminu (i.m. nebo i.v.), jedná se o chelatační látku, která vyváže zbývající železo ve střevě (22).

Deferoxamin se používá také u pacientů závislých na transfuzích. Z důvodu neustálého doplňování krve a velkému rozkladu červených krvinek dochází k hromadění železa. Deferoxamin je podáván pomocí infuze v dávkách mezi 25-50 mg na kg hmotnosti a den po dobu 8-12 hodin (23).

5.3 Chelátotvorné látky

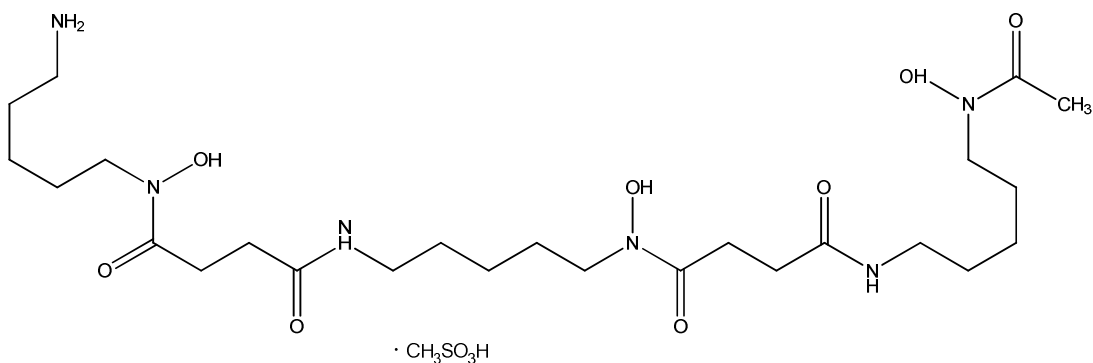
Jedná se o chemické látky, které mají v molekule několik vazebných míst pro vazbu na kov. Název je odvozen z řeckého „chele“ = klepeta. Cheláty jsou tedy komplexy takové látky s iontem kovu. Protože mají chelátotvorné látky vysokou afinitu k vazbě na kov, používají se v praxi jako antidota při otravách těžkými kovy. Chelatovaný kov je v komplexu pevně vázaný a pro organismus tedy netoxický. Z organismu se vyloučí i poměrně koncentrovanou močí. Příkladem takové látky je edetan vápenatodisodný (EDTA), který se používá k léčbě otravy olovem (Obr. 3). Vápenaté ionty jsou z komplexu vytlačeny afinitnějším olovem a to je poté odvedeno z organismu (24).



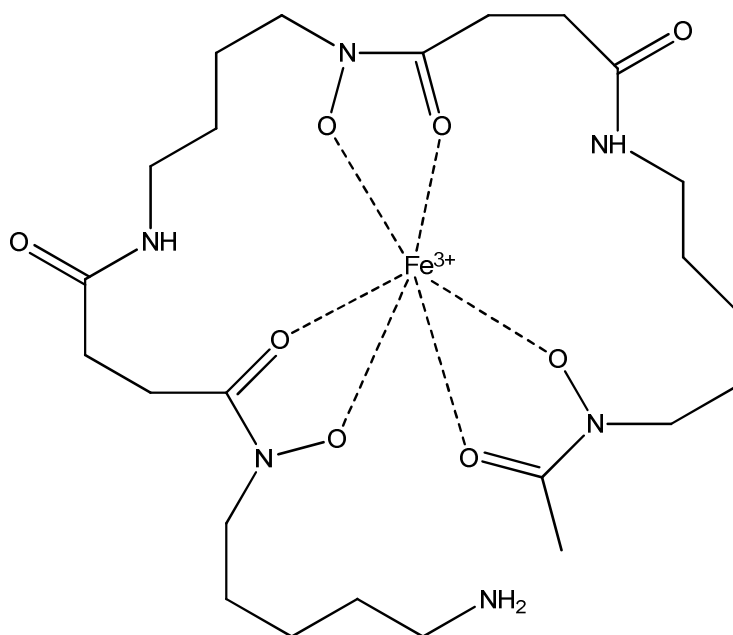
Obrázek 3: Vznik komplexu EDTA s kovem

5.3.1 Deferoxamin

Látka patří mezi chelatační činidla používaná v praxi pro vychytávání železa. Deferoxamin byl roku 1964 izolován jako produkt bakterie *Streptomyces pilosus*. Již o sedm let později byla látka otestována na více než pětiset lidech a zavedena pro praxi. Látka je distribuována ve formě suché injekce (např. Desferal, Obr. 6) a před podáním rozpouštěna vodou a aplikována pomocí pomalé infuze. Pacientům je aplikována infuze 8-12 hodin denně 5-7 dní v týdnu, což vypovídá o celkové nákladnosti a velké časové náročnosti terapie. Při perorálním podání nedochází téměř k absorpci do organismu a tak je vhodné pouze pro odstranění dávky železa, která se ještě nestihla z GIT vstřebat. Sloučenina má vysokou afinitu k iontům železa, ale centrálně vázané ionty jako jsou v molekule hemu, feritinu, transferinu nebo cytochromu neváže. V nechelatovaném stavu tvoří molekula DFX téměř lineární strukturu (Obr. 4), po navázání kovu se molekula stočí a uzavře ho do středu struktury (Obr. 5). Deferoxamin má schopnost vázat trojmocné ionty kovů a to téměř výhradně ionty Fe^{3+} , mezi další patří Al^{3+} ionty, ke kterým je ale jeho afinita výrazně nižší. Část z podaného množství látky je schopná vstupovat do buněk a vázat volné intracelulární železo. Účinnost vazby deferoxaminu odpovídá přibližně 100 g deferoxaminu na eliminaci 8,5 mg železa z organismu. V ledvinách nedochází k zpětné resorpci a tak 100 % podané látky je vyloučeno močí. Jako u jiných léčiv i u deferoxaminu se mohou vyskytnout nežádoucí účinky, mezi které patří hypotenze, šok, akutní ledvinové selhání a alergická reakce (25).



Obrázek 4: Deferoxamin mesylát



Obrázek 5: Chelát deferoxaminu a železitého iontu



Obrázek 6: Lék Desferal- deferoxamin (26)

5.4 Alkaloidy

Jedná se o chemicky velmi různorodou skupinu. Alkaloidy jsou zásadité látky organického původu, které obsahují ve své molekule dusík vázaný zpravidla v heterocyklické struktuře. Převážná většina známých alkaloidů je rostlinného původu. Mezi nejznámější a nejširší alkaloidní rostlinné čeledi patří Papaveraceae, Solanaceae, Liliaceae a Ranunculaceae. V současné době bylo popsáno přes 6000 různých látek.

Alkaloidy se vyznačují silným fyziologickým účinkem v živočišném těle, často se jedná o potenciální jedy, psychotropní látky, ale v závislosti na dávce i léčiva. Rostliny tyto látky produkují pro svou obranu a také jako způsob eliminace dusíku (27).

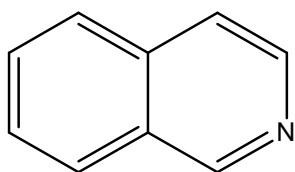
Alkaloidy s kyselinami ochotně vytvářejí soli. V této formě zpravidla bývají obsaženy i v rostlinách. Soli alkaloidů jsou na rozdíl od alkaloidů samotných dobře rozpustné ve vodě, čehož se s výhodou využívá při jejich izolaci, kdy se čistý alkaloid převede do organického rozpouštědla (28).

5.4.1 Isochinolinové alkaloidy

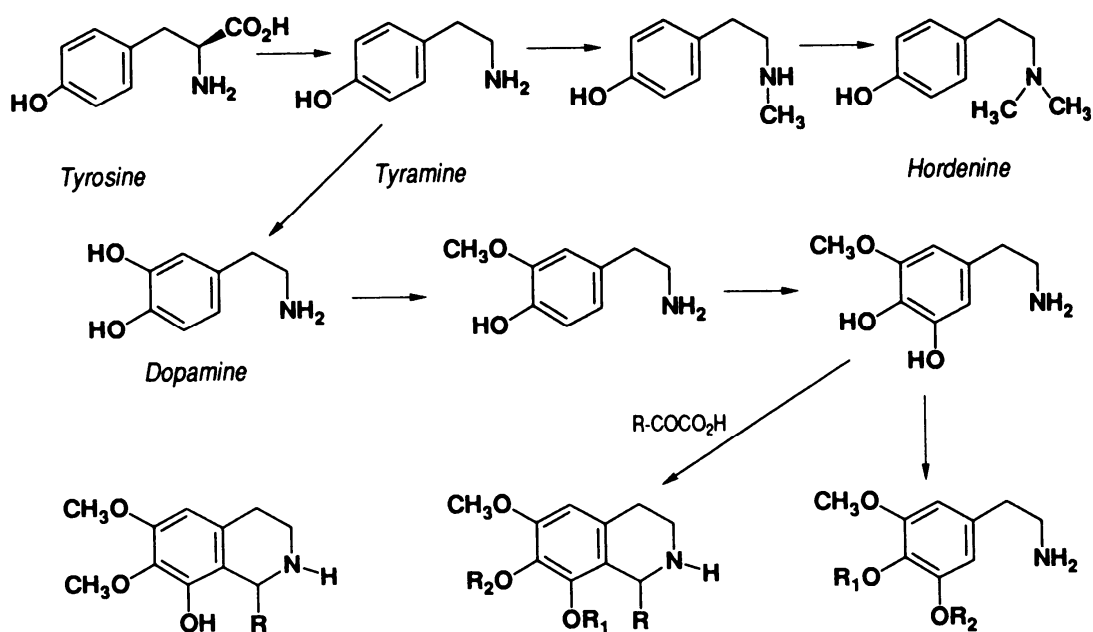
Pro tuto práci byli vybráni zástupci isochinolinových alkaloidů různých chemických struktur, aby bylo možné ze získaných dat, co nejlépe interpretovat závislost struktury na aktivitě. V případě zjištění zajímavých výsledků, byl v průběhu měření soubor alkaloidů rozšiřován o strukturně blízké alkaloidy. Tak vznikla možnost porovnat vliv jednotlivých skupin v molekule na chelatační vlastnosti.

Isochinolinové alkaloidy (základní struktura uvedena na obr. 7) jsou v rostlinách syntetizovány z aminokyseliny tyrozinu (syntéza základního skeletu je uvedena na obr. 8). Podle dalších obměn molekuly je můžeme rozdělit dle typu na morfinany, benzyloisochinoliny, protoberberiny a aporfíny. Mezi společné vlastnosti alkaloidů těchto struktur patří snížení vnímání bolesti a spasmolytický efekt. Protoberberiny a aporfíny inhibují LOX (lipoxygenáza) díky svému silnému antiperoxidačnímu účinku. Enzym zajišťuje tvorbu leukotrienů, regulačních molekul modulujících zánětlivou a alergickou reakci (21). Dále tyto skupiny alkaloidů redukují proliferaci buněk a zrychlené stárnutí buněk rakovinných linií (22). Protoberberidinové alkaloidy vykazují účinek proti Alzheimerově nemoci inhibicí AChE a butyrylcholinesterázy a antioxidačním působením v organismu (31).

Mezi hlavní čeledi s obsahem těchto alkaloidů patří Papaveraceae (mákovité), Fumariaceae (zeměděmovité), Berberidaceae (dřišťálovité), Menispermaceae (lunoplodovité), Amaryllidaceae (amarylkovité) a Ranunculaceae (pryskyřníkovité).



Obrázek 7: Isochinolin



Obrázek 8: Syntéza tetrahydroisochinolinu z tyrozinu (32)

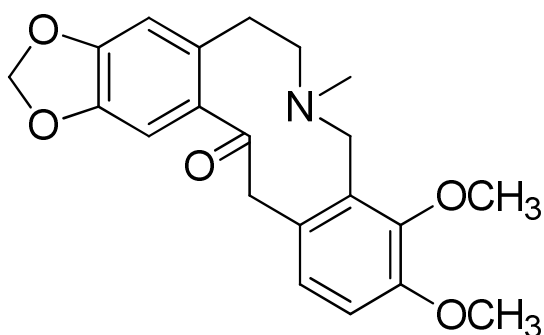
5.4.1.1 Allokryptopin a protopin

Tyto alkaloidy jsou nejčastěji obsaženy společně v rostlinách čeledi Papaveraceae a Fumariaceae. Oba alkaloidy byly předmětem mnoha studií, při kterých byla zjištěna antiparazitická aktivita a pouze slabá cytotoxicita v porovnání s jinými typy isochinolinových alkaloidů (33). Na zvířecích modelech byla prověřena antiarytmická, antitrombotická, protizánětlivá (34, 35), hepatoprotektivní a antioxidační aktivita. Účinky mohou vycházet ze schopnosti protopinu (Obr. 10) inhibovat vápníkový, sodíkový a draselný kanál.

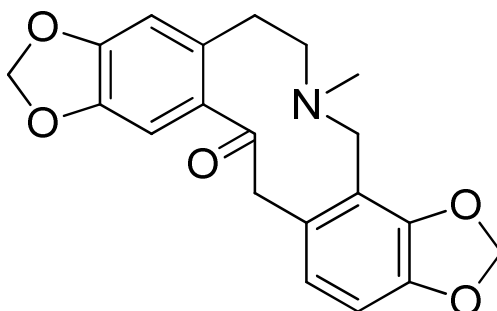
Allokryptopin (Obr. 9) izolovaný z *Glaucium arabicum* má účinky na α -adrenergní receptory hladkého svaly močového měchýře a tenkého střeva, čímž způsobuje jeho relaxaci (36).

U obou alkaloidů izolovaných z *Glaucium flavum* byla prověřena antimikrobní aktivita (37). U stejných alkaloidů izolovaných z *Glaucium oxylobum* se vyskytovala také antifungální aktivita (38).

Byla objevena také aktivita proti určitým druhům hlístic (*Bursaphelenchus xylophilus*, *Caenorhabditis elegans* a *Meloidogyne incognita*) u obou alkaloidů izolovaných z *Macleaya cordata* (39).



Obrázek 9: Allokryptopin



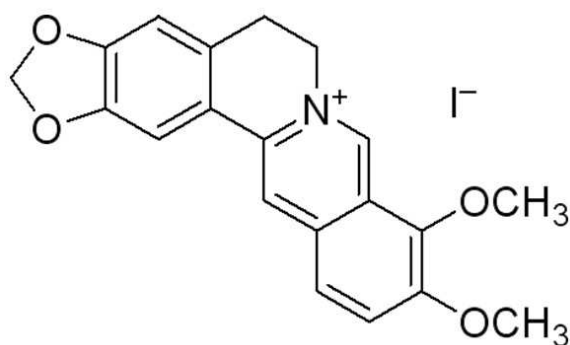
Obrázek 10: Protopin

5.4.1.2 Berberin

Dalším alkaloidem s isochinolinovým skeletem v molekule je berberin (Obr. 11). Rostliny s obsahem tohoto alkaloidu se řadí do čeledí Berberidaceae (*Berberis vulgaris*, *B. aquifolium*...), Rutaceae (*Phellodendron amurense*), a Ranunculaceae (*Coptis chinensis*, *C. japonica*). Dřevina obecná (*Berberis vulgaris*) obsahuje alkaloidy hlavně v podzemní části rostliny, v nadzemní části je jich minimum a plody neobsahují alkaloidy vůbec. Nalezneme ho zpravidla v podzemních částech rostlin případně v kůře či stonku.

Berberin byl objeven v roce 1824 v kůře *Geoffroya inermis* a postupně i v dalších rostlinách. Izolovaný berberin krystalizuje v žlutých jehlicovitých krystalech a je rozpustný ve vodě a alkoholu (40).

Jako ostatní isochinolinové alkaloidy vykazuje i berberin antibakteriální, antimykotickou a antiparazitární aktivitu. Působí také jako inhibitor acetylcholinesterázy (AChE). Využití berberinu ale není možné v praxi, protože se jedná o kvartérní alkaloid, kterému jeho náboj neumožňuje přechod přes HEB (hematoencefalická bariéra). U velmi příbuzné sloučeniny pseudoberberinu byla pozorována také schopnost zlepšovat dlouhodobou paměť a pasivní učení (41).



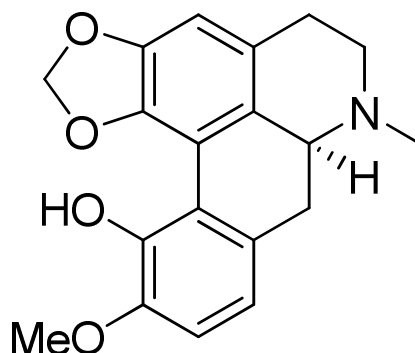
Obrázek 11: Berberin jodid

5.4.1.3 Bulbokapnin

Alkaloid ze skupiny vznikající metabolizací fenylalaninu. Bulbokapnin (Obr. 12) se nachází v rostlinách *Corydalis cava*, *C. vaginans*, *C. marschalliana* a *Glaucium vitellinum*.

Mezi vlastnosti bulbokapninu patří schopnost inhibice acetylcholinesterázy i butyrylcholinesterázy. Snížené množství acetylcholinu v periferní kůře je typické pro pacienty s Alzheimerovou chorobou (16).

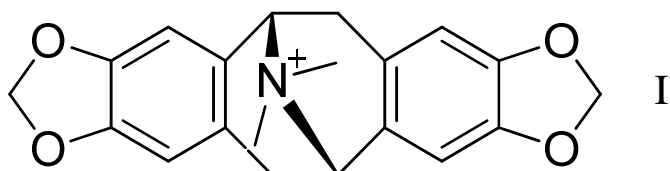
Aporfinové alkaloidy vykazují také antioxidační aktivitu díky odnímání volného kyslíku, aktivních radikálů a inhibicí hypoxanthin-xanthin oxidáza systému (42).



Obrázek 12: Bulbokapnin

5.4.1.4 Kalifornidin

Kvartérní alkaloid byl izolován z rostliny *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae) (Obr. 14). Jedná se o asi 60 cm vysokou rostlinu s oranžovým květem rostoucí v severní Americe, jak už název napovídá především v Kalifornii. Kalifornidin (Obr. 13) je její hlavní alkaloid, může být obsažen až v 0,2% koncentraci (43). Alkaloid se strukturou řadí mezi aporfiny. Svým účinkem v organismu snižuje aktivitu na 5- hydroxytryptofanovém (5-HT) receptoru (44). Působí také na AChE jako její inhibitor, terapeuticky ale není na léčbu Alzheimerovy nemoci použitelný, protože kvartérní struktura brání přechodu přes HEB (45).



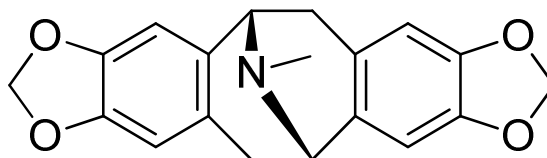
Obrázek 13: Kalifornidin jodid



Obrázek 14: *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) (46)

5.4.1.5 *Eschscholtzin*

Rostlina *Eschscholzia californica* obsahuje mimo kalifornidinu a protopinu také alkaloid eschscholtzin (Obr. 15). Tyto alkaloidy jsou převážně zodpovědné za sedativní a spasmolytické účinky rostliny (47). V rostlinách je syntetizován pomocí N-methylace ze svého prekurzoru retikulinu (48).

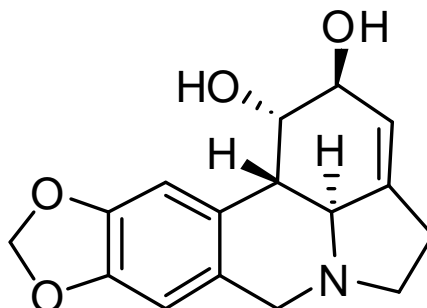


Obrázek 15: Eschscholtzin

5.4.1.6 *Lykorin*

Lykorin (Obr. 16) patří mezi alkaloidy čeledi Amaryllidaceae. Celá čeleď obsahuje více než 800 převážně tropických druhů, ze kterých se v České republice vyskytuje *Leucojum* L. (bledule), *Galanthus* L. (sněženka) a *Narcissus* L. (narcis). Alkaloidy se vyskytují jak v cibuli, tak v nati rostliny. Lykorin byl vyizolován roku 1877 z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. Tyto rostliny byly pro své účinky používány v tradiční medicíně. Využití protirakovinného působení popsal už Hypokrates (460-370 BC). Antiproliferativní aktivita byla mnohem později ověřena studiemi (49). Tím se stal lykorin a jeho deriváty jednou z nadějných léčivých látek, nebo

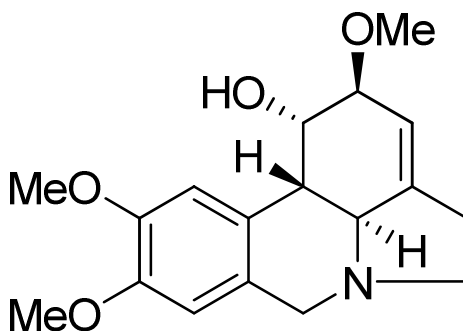
její strukturální předlohou (50). Dále byla prokázána inhibiční aktivita proti *Plasmodium falciparum*, které je původcem malárie. Jako ostatní alkaloidy izolované z rostlin čeledi Amaryllidaceae vykazuje i lykorin antibakteriální, antifungální, protivirovou a analgetickou aktivitu. Jsou také inhibitory AChE, čehož se využívá k léčbě neurodegenerativních poruch (51).



Obrázek 16: Lykorin

5.4.1.7 Galantin

Galantin (Obr. 17) patří mezi další zástupce alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae. Nachází se především v hlízách rostlin *Galanthus alwesii*, *G. nivalis*, *Lycoris sanguinea*, *Narcissus jonquilla*. Galantin patří mezi alkaloidy lykorinového typu.

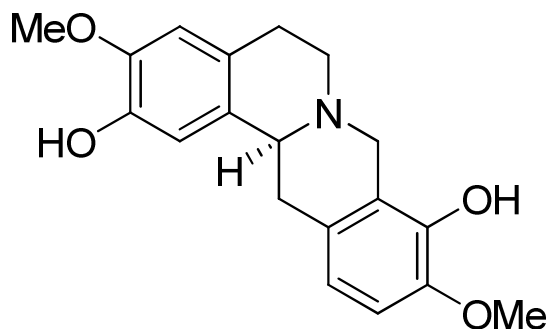


Obrázek 17: Galantin

5.4.1.8 Skulerin

Alkaloid patří mezi protoberberiny. V rostlinách je syntetizován z retikulinu pomocí tzv. „berberine- bridge“ enzymu za přítomnosti kyslíku (52). Skulerin

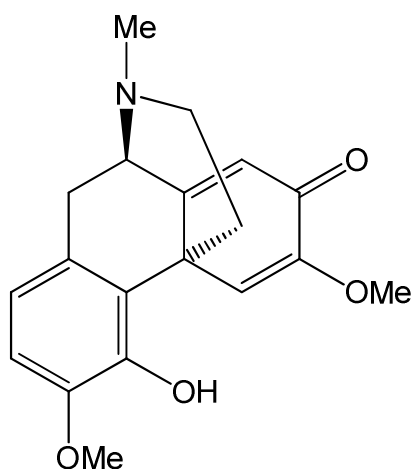
(Obr. 18) se nachází v čeledích Papaveraceae (*Papaver somniferum*), Euphorbiaceae (*Croton flavens*), a několika zástupcích čeledi Fabaceae (rod *Erythrina*). Podle studií skulerin působí jako antagonist α_2 -adrenoreceptoru, α_{1D} -adrenoreceptoru a 5-HT receptoru. Také byla zjištěna aktivita na GABA_A receptoru, kde působí jako agonista. Odvozená látka *l*-chloroskulerin je v současné době pro svůj agonistický účinek na dopaminových D1 a antagonistický na D2 receptorech zkoumána jako nová léčba schizofrenie (53).



Obrázek 18: Skulerin

5.4.1.9 *Sinoakutin* (Obr. 19)

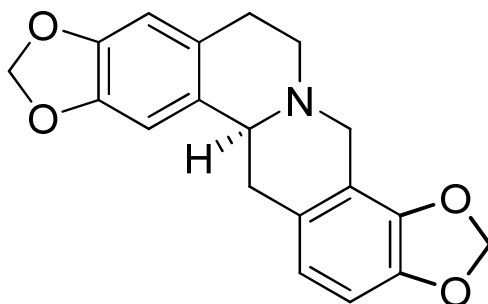
Alkaloid byl vyizolován z rostliny *Sinomenium acutum* (Menispermaceae) pocházející z Číny. Jedná se o bezbarvou sloučeninu, která vykazuje ochranný antioxidační efekt proti oxidačnímu poškození buněk způsobeného hydroxidovými a peroxidovými radikály (54).



Obrázek 19: Sinoakutin

5.4.1.10 Stylopin

Stylopin (Obr. 20) se nejčastěji vyskytuje v rostlinách čeledí Papaveraceae a Fumariaceae. Ve vysoké míře se nachází v rostlině *Chelidonium majus* (Papaveraceae), u které představuje jeden z hlavních alkaloidů. Stylopin inhibuje COX-2 (cyklooxygenáza-2) a iNOS (induktabilní-NO-syntáza), díky čemuž dochází ke snížení syntézy NO a PGE2 a tedy protizánětlivému účinku alkaloidu (55).



Obrázek 20: Stylopin

6 Praktická část

6.1 Materiál

mikrotitrační destičky
automatické pipety různých objemů
vícekanálové pipety různých objemů
mikrocentrifugační zkumavky

6.2 Chemikálie

Použité chemikálie byly získány od firmy Sigma-Aldrich.

DMSO (dimethyl sulfoxid)
Ferozin (sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl) bisbenzensulfonové
kyseliny
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piper-azineethansulfonová kyselina)
HEPES sodná sůl
Hydroxylamin chlorid (HA) ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$)
Chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
Kyselina octová (CH_3COOH)
Octan sodný ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$)
Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

6.3 Přístrojové vybavení

Byl použit spektrofotometr pro čtení mikrotitračních destiček Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.A.). Dále třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (Německo) a třepačka pro zkumavky IKAVORTEX GENIUS 3 (Německo) od stejné firmy.
Pro usnadnění rozpouštění byla využita ultrazvuková lázeň KRAINTEK 1 (Slovensko).
Kontrola správnosti pH byla provedena na pH metru HI221 Calibration check microprocessor pH meter, Hanna instruments (Rumunsko).

6.4 Testované látky

Allokryptopin, protopin a stylopin byly vyizolovány z *Chelidonium majus* (17). Berberin jodid byl získán z rostliny *Berberis vulgaris*, galantin a lykorin byl izolován ze

Zephyranthes robusta na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Bulbokapnin a sinoakutin byly získány z rostliny *Corydalis cava* (19). Kalifornidin jodid, eschscholtzin a sinoakutin byly vyizolovány z *Eschscholtzia californica* (18). Deferoxamin, který byl použit jako referenční látka, byl zakoupen od firmy Novartis (Švýcarsko).

6.5 Metody

6.5.1 Příprava zásobních roztoků

roztok ferozinu- 5 mM

- molekulová hmotnost ferozinu: 492,5 g/mol
- ferozin byl smísen s vodou do požadované koncentrace

roztok železnatých iontů- 5 mM

- molekulová hmotnost síranu železnatého: 278,02 g/mol
- síran železnatý byl smísen s vodou do vzniku požadované koncentrace
- dále zředěno na 250 μ M

roztok železitých iontů- 5 mM

- molekulová hmotnost chloridu železitého: 270,29 g/mol
- ke krystalům chloridu železitého byla přidána voda do požadované koncentrace
- dále v čas potřeby zředěno na 250 μ M

Roztok hydroxylaminu- 10 mM

- molekulová hmotnost HA: 69,49 g/mol
- HA byl smísen s vodou do vzniku 10 mM koncentrace

Roztoky pufrů pro pH 4,5 a 5,5

- byl využit acetátový pufr, který vznikl smísením kyseliny octové, octanu sodného a vody
- pH roztoku bylo upraveno pomocí pH metru

Roztoky pufrů pro pH 6,8 a 7,5

- pro přípravu pufrů byla použita HEPES kyselina, HEPES sodná sůl a voda
- vzniklé pH roztoku bylo upraveno pomocí pH metru

Roztoky alkaloidů

- pro přípravu roztoku alkaloidů byl příslušný alkaloid rozpuštěn v DMSO do vzniku požadované koncentrace

6.5.2 Zkoušky roztoků iontů

- železnaté ionty
 - Kontrola koncentrace železnatých iontů v připraveném roztoku pomocí změření absorbance
 - Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl DMSO, 50 μl roztoku Fe^{2+} (250 μM) a 50 μl roztoku ferozinu (5 mM). Po napipetování všech složek byla ihned změřena absorbance při 562 nm. Pokud se naměřené hodnoty pohybovaly okolo 1.0, roztok obsahoval správnou koncentraci a byl vhodný pro měření.
- železitě ionty
 - Kontrola koncentrace železitých iontů v připraveném roztoku pomocí změření absorbance
 - Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl DMSO, 50 μl roztoku Fe^{3+} (250 μM), 50 μl roztoku hydroxylaminu (10 μM) a 50 μl roztoku ferozinu (5 mM). Po napipetování všech složek byla okamžitě změřena absorbance při 562 nm. Pokud byly naměřené hodnoty okolo 1.0, obsahoval roztok správnou koncentraci iontů. A byl tedy vhodný pro další měření.

6.5.3 Kalibrace železnatých iontů

Pro vytvoření kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci Fe^{2+} iontů byly připraveny roztoky o různých koncentracích, následně změřena absorbance a naměřenými hodnotami proložena přímka. Ze zásobního roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ byly připraveny koncentrace 75 mM, 60 mM, 50 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 3 mM a 0 mM. Do jamky bylo napipetováno 50 μl roztoku Fe^{2+} iontů o dané koncentraci, 100 μl DMSO a 50

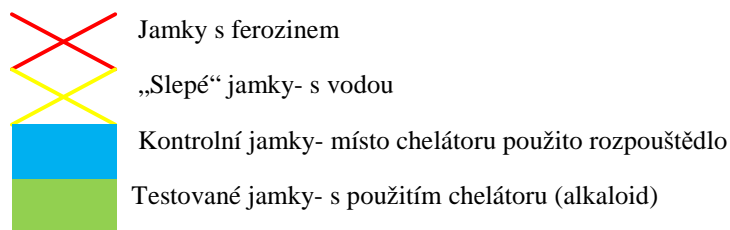
μl roztoku ferozinu (5 mM). Po pěti minutách byla změřena absorbance při 562 nm. Z hodnot byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci iontů, který je uveden ve výsledcích (Obr. 22).

6.5.4 Chelatace železnatých iontů

6.5.4.1 Bez úpravy pH

- 1) Na mikrotitrační destičce (Obr. 21) byly pro každou koncentraci použity dvě testovací jamky a dvě jamky slepé (bez použití ferozinu) a zároveň pro celé měření byly použity 4 kontrolní jamky, ve kterých není obsažen chelátor (alkaloid).

Koncentrace testovaného roztoku (mM)	10	1	0,1	0
Absorbance s ferozinem				
Absorbance s ferozinem				
Absorbance s vodou				
Absorbance s vodou				



Obrázek 21: Rozložení na mikrotitrační destičce

- 2) Do všech testovacích jamek bylo napipetováno 100 μl roztoku alkaloidu – chelátoru o příslušné koncentraci. Roztoky byly připraveny předem pro každý alkaloid specificky (standardně 10 mM, 1 mM, 0,1 mM a 0 mM). Do kontrolních jamek bylo napipetováno 100 μl rozpouštědla (DMSO).
- 3) Do všech jamek bylo přidáno 50 μl roztoku železnatých iontů o koncentraci 0,25 mM.
- 4) Destička byla vložena na 2 minuty do třepačky.

- 5) Poté bylo do testovacích jamek napipetováno 50 μ l ferozinu a do slepých jamek 50 μ l destilované vody.
- 6) Okamžitě byla změřena absorbance při 562 nm.
- 7) Po 5-ti minutách byla změřena absorbance při stejné vlnové délce znovu (4 min 30 s start druhého měření).

6.5.4.2 S úpravou pH- 4,5, 5,5, 6,8 a 7,5

- 1) Na mikrotitrační destičce byly pro každou koncentraci využity dvě testovací jamky a dvě jamky slepé (bez použití ferozinu), zároveň byly pro sadu měření použity 4 kontrolní jamky, ve kterých není obsažen chelátor (alkaloid).
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 150 μ l příslušného pufru pro úpravu pH na hodnotu 4,5, 5,5, 6,8 nebo 7,5.
- 3) Dále bylo přidáno 50 μ l roztoku alkaloidu o příslušné koncentraci a do kontrolních jamek 50 μ l rozpouštědla DMSO. Pro měření při pH 7,5 bylo dále do všech jamek napipetováno 50 μ l HA.
- 4) Do všech jamek bylo napipetováno 50 μ l roztoku Fe^{2+} 0,25 mM.
- 5) Destička byla vložena na 2 minuty do třepačky.
- 6) Bylo přidáno 50 μ l ferozinu do testovaných jamek a 50 μ l destilované vody do slepých jamek.
- 7) Okamžitě byla měřena absorbance při 562 nm.
- 8) Podruhé byla změřena absorbance při stejné vlnové délce po pěti minutách (start měření za 4 min 30 s).

6.5.5 Chelatace celkového železa

6.5.5.1 Bez úpravy pH

- 1) Na mikrotitrační destičce byly pro každou koncentraci využity dvě jamky testovací a dvě slepé (slepý vzorek bez použití ferozinu), ke každému setu bylo navíc přidána čtveřice jamek jako kontrolní.
- 2) Do všech jamek, kromě kontrolních, bylo napipetováno 100 μ l roztoku alkaloidu - chelátoru o příslušné koncentraci (standardně byly na úvod vybrány koncentrace 10 mM, 1 mM, 0,1 mM a 0 mM). Do kontrolních jamek bylo napipetováno 100 μ l rozpouštědla (DMSO).

- 3) Z předpřipraveného roztoku železitých iontů o koncentraci 5 mM byl naředěn roztok na koncentraci 0,25 mM a ihned napipetován do všech jamek.
- 4) Vzorky byly vloženy na dvě minuty do třepačky.
- 5) Do všech jamek bylo napipetováno 50 μ l HA o koncentraci 10 mM, aby bylo dosaženo úplné redukce Fe^{3+} iontů na Fe^{2+} ionty, které mohou reagovat s ferozinem.
- 6) Vzorek byl vložen do třepačky na 1 minutu.
- 7) Do testovacích jamek bylo přidáno 50 μ l roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM a 50 μ l destilované vody do jamek pro slepé vzorky.
- 8) Ihned byla pomocí spektrofotometru měřena absorbance při 562 nm.
- 9) Po pěti minutách byla změřena absorbance při 562 nm znovu (start měření po 4 min 30 s).

6.5.5.2 Při pH 4.5

- 1) Do všech jamek bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 4.5.
- 2) Do testovaných jamek bylo napipetováno 50 μ l chelátoru (alkaloidu) o příslušné koncentraci a do kontrolních jamek 50 μ l rozpouštědla (DMSO).
- 3) Dále bylo přidáno 50 μ l čerstvě naředěného roztoku Fe^{3+} na koncentraci 0,25 mM.
- 4) Vzorky byly třepány 2 minuty.
- 5) Do všech jamek bylo přidáno 50 μ l HA.
- 6) Vzorky byly třepány 1 minutu.
- 7) Bylo přidáno 50 μ l roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM do testovacích jamek a 50 μ l destilované vody do jamek pro slepý vzorek.
- 8) Ihned byla měřena absorbance při 562 nm a poté znovu po pěti minutách (start měření po 4 min 30 s).

6.6 Vyhodnocení výsledků

Naměřená data byla zpracována pomocí statistického programu GraphPad , který umožnil porovnat schopnost chelatace Fe^{2+} a $\text{Fe}^{2/3+}$ iontů jak číselně tak graficky. Pro statistické porovnání byl použit jednofaktorový ANOVA test.

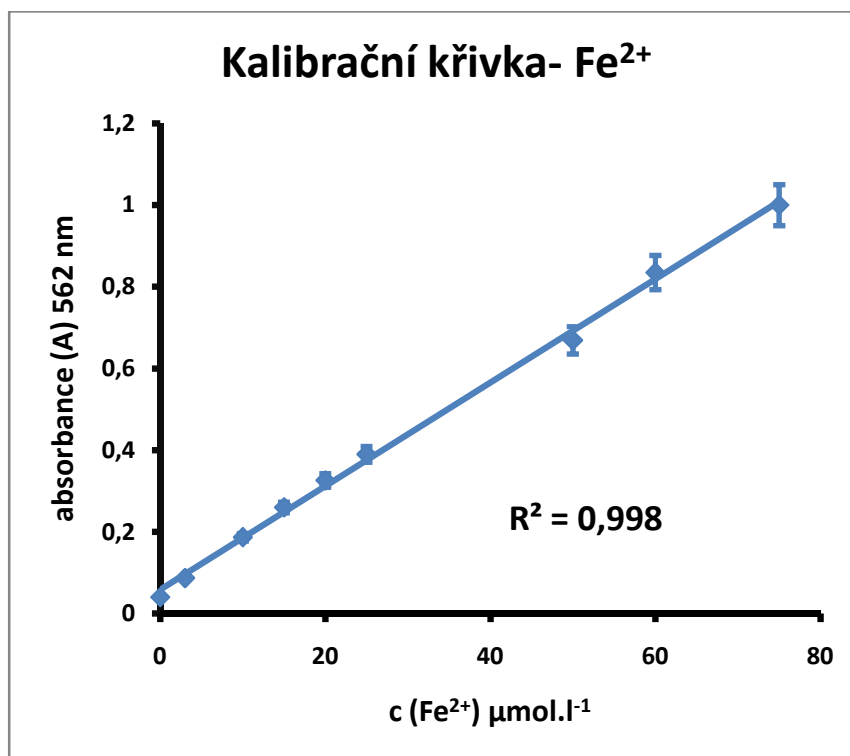
6.7 Výsledky

6.7.1 Kalibrační křivka pro Fe^{2+} ionty

Graf byl sestaven z naměřených hodnot absorbance v závislosti na rozdílné koncentraci iontů Fe^{2+} . Byly měřeny tyto koncentrace 75 mM, 60 mM, 50 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 3 mM a 0mM. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.1. Z naměřených hodnot vyplývá, že se jedná o závislost lineární (Obr. 22).

Tabulka 1: Závislost absorbance na koncentraci- naměřené hodnoty pro kalibrační křivku

Koncentrace Fe^{2+} final	75	60	50	25	20	15	10	3	0
Absorbance	1,04	0,847	0,662	0,406	0,336	0,251	0,194	0,091	0,043
	0,936	0,796	0,621	0,383	0,3	0,263	0,177	0,085	0,039
	1,024	0,862	0,724	0,381	0,342	0,266	0,19	0,085	0,039
Absorbance průměr	1	0,835	0,669	0,39	0,326	0,26	0,187	0,087	0,040333

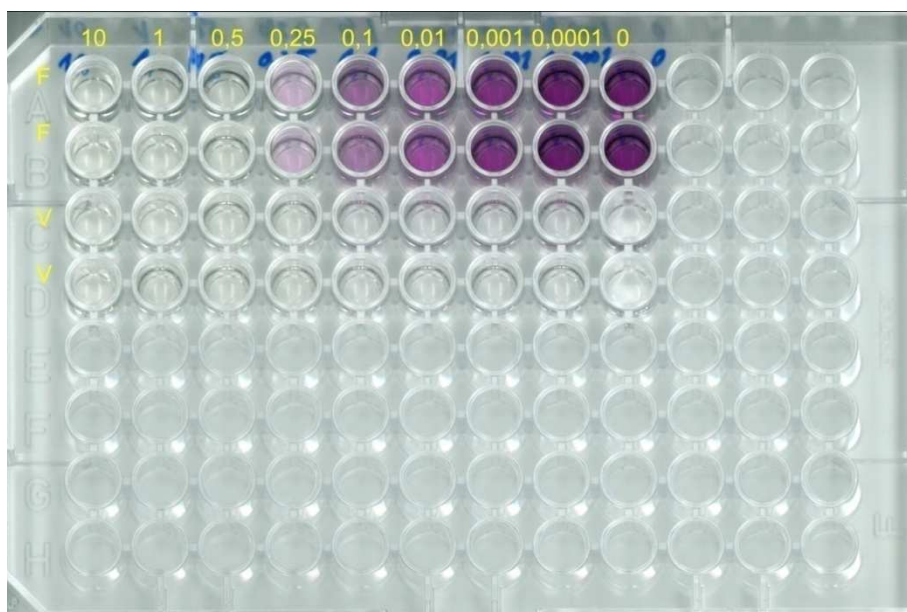


Obrázek 22: Kalibrační křivka Fe^{2+}

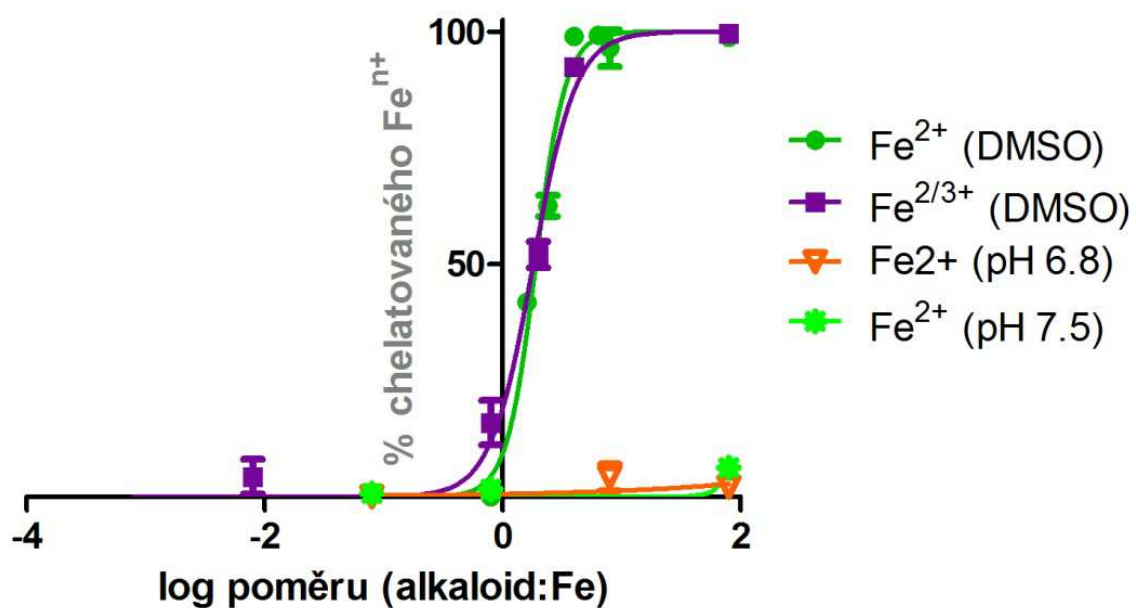
6.8 Chelatační aktivita jednotlivých alkaloidů

Ztitrovaná mikrotitrační destička chelatace protopinu pro koncentrace 10 mM až 0,0001 mM je pro ukázkou uvedena před grafy (Obr. 23).

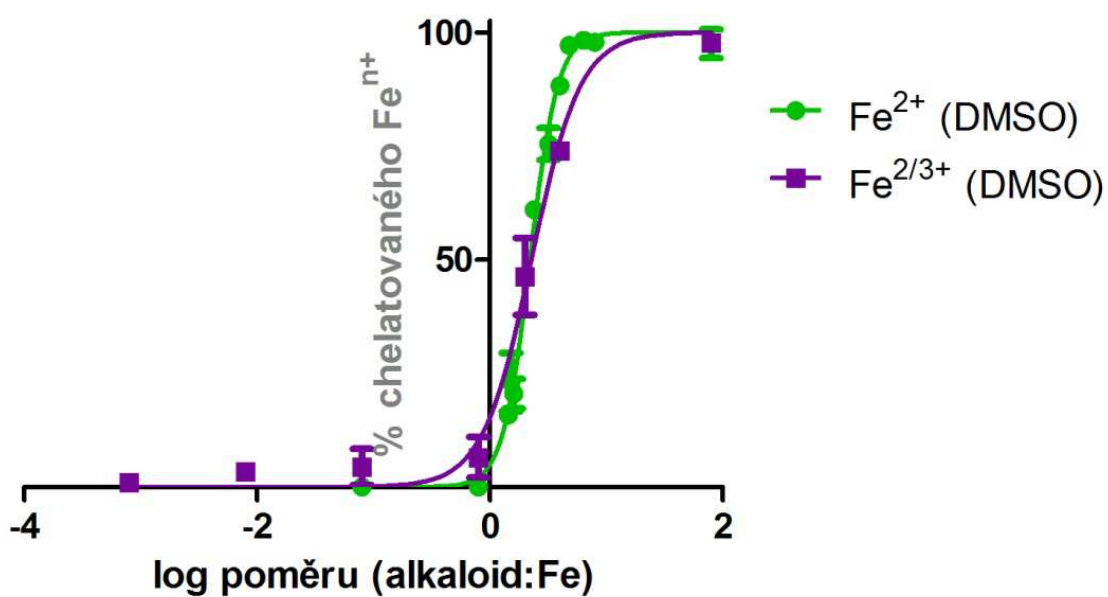
Aktivita alkaloidů naměřená pomocí spektrofotometru byla převedena do grafů (Obr. 24-32). Berberin a kalifornidin žádnou schopnost chelatovat ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} nevykázali, jejich grafy tedy nebyly vytvořeny. Na závěr je vložen graf deferoxaminu (Obr. 33), se kterým byla aktivita alkaloidů porovnávána jako s referenční látkou. Na závěr byly vloženy grafy porovnávající chelatační aktivitu jednotlivých látek při poměru koncentrace chelátor železo 1:1 a 10:1 (log poměru 1 a 0) (Obr. 34 a 35). Množství železnatých iontů v procentech, které vybraný alkaloid dokázal chelatovat je uvedeno v tabulce č. 2. Tabulka č. 3 zachycuje množství celkového železa v procentech chelatovaného vybranými alkaloidy.



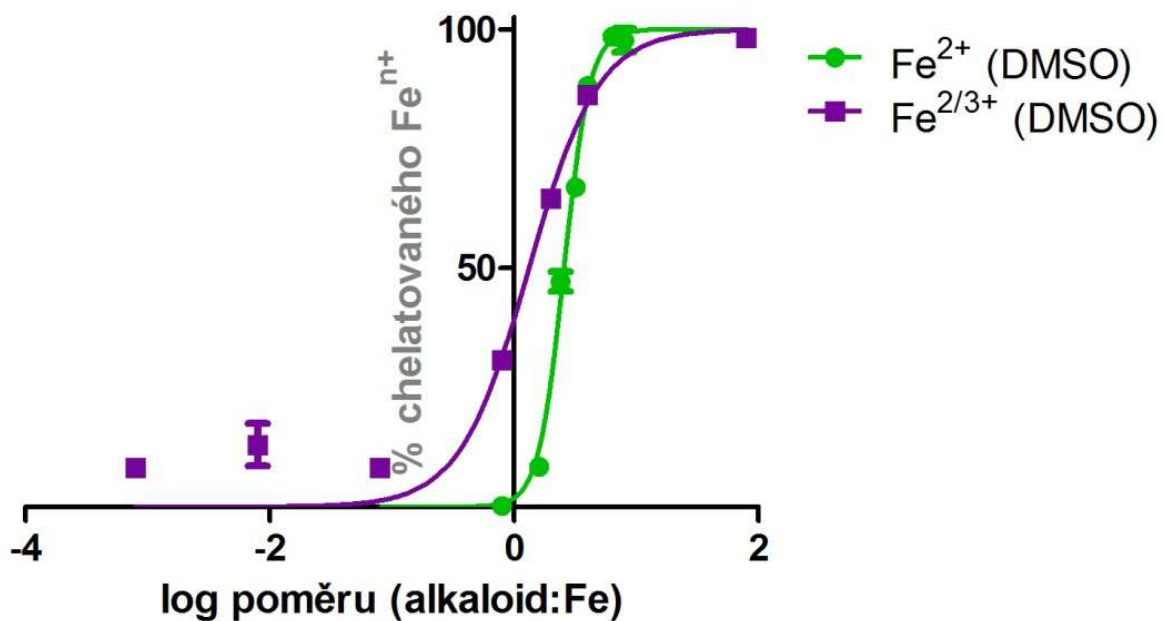
Obrázek 23: Mikrotitrace chelatace protopinu- vizualizace ferozinem dle stupně chelatace Fe²⁺ iontů



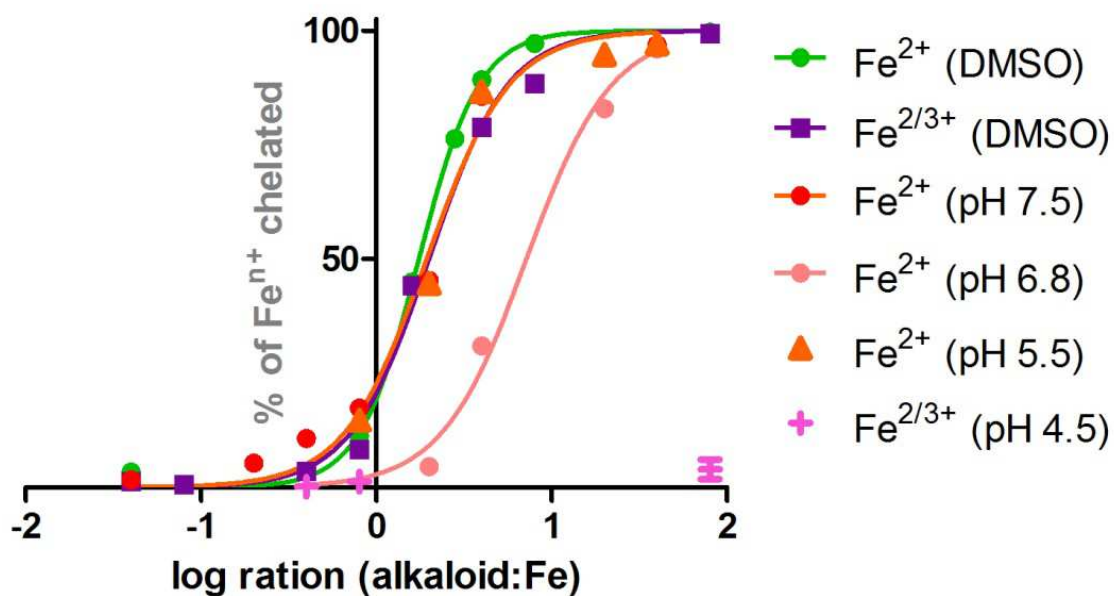
Obrázek 24: Železo-chelatační aktivity allokryptopinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa.



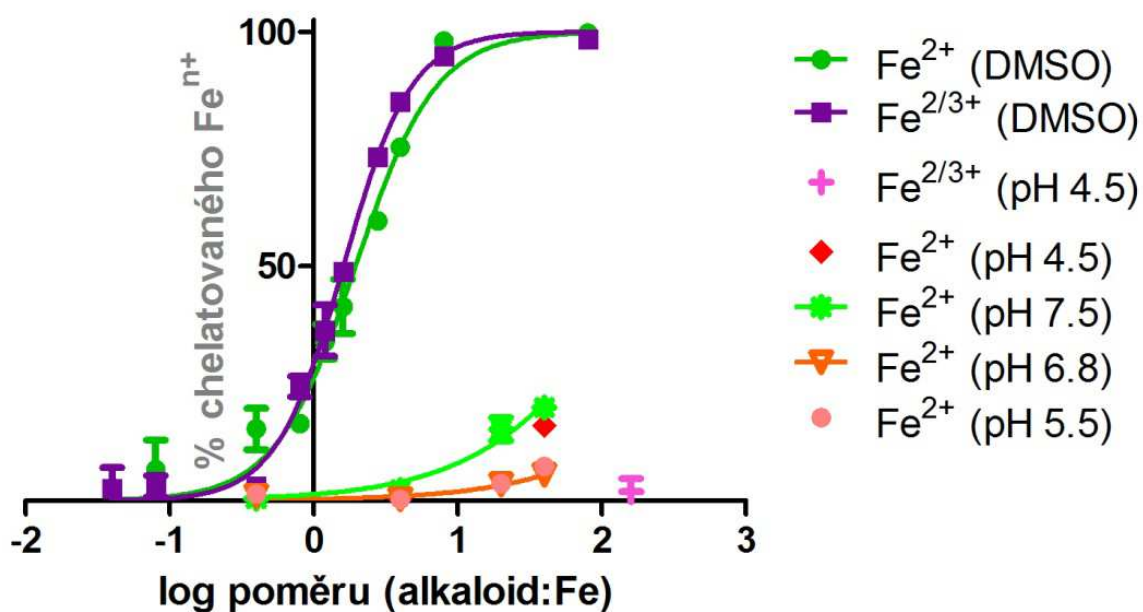
Obrázek 25: Železo-chelatační aktivity bulbokapninu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



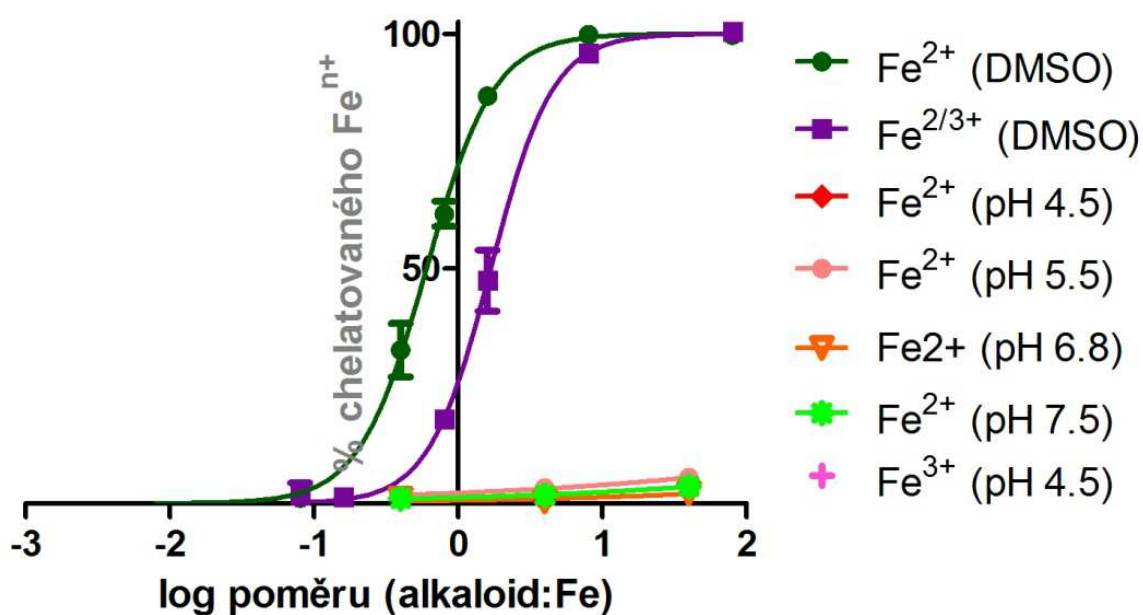
Obrázek 26: Železo-chelatační aktivity eschscholtzinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



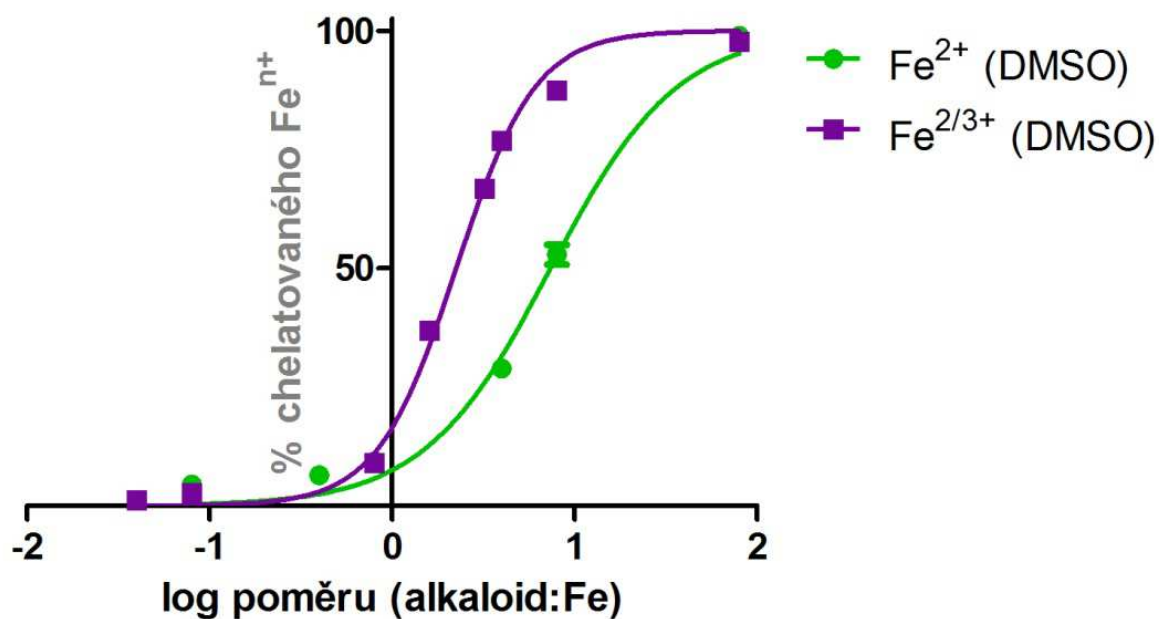
Obrázek 27: Železo-chelatační aktivity galantaminu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



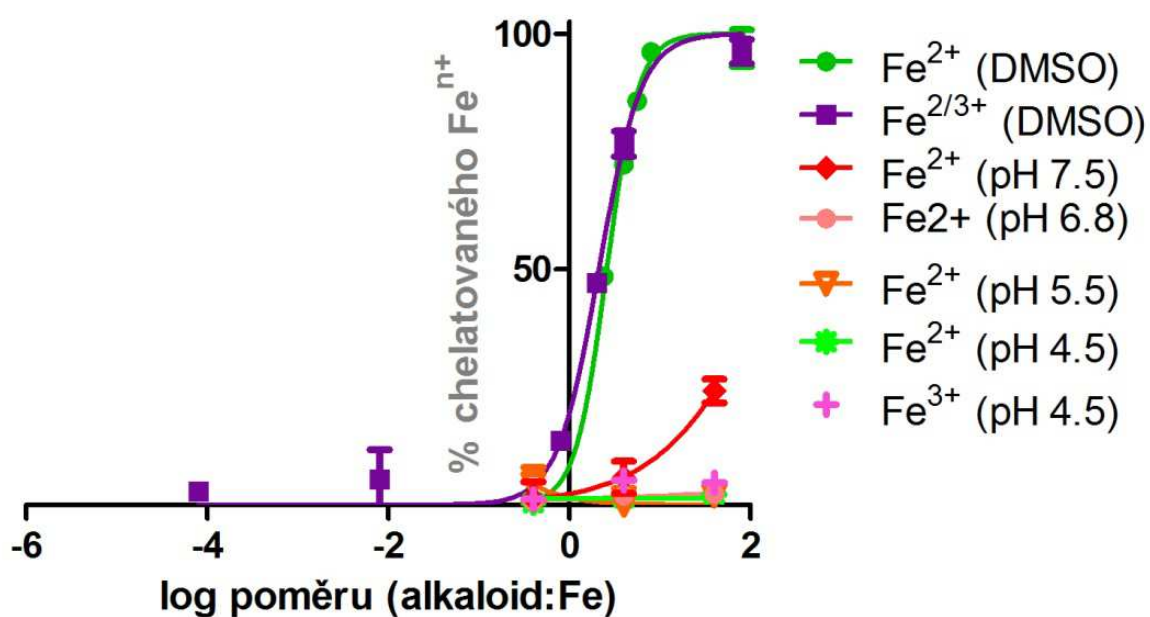
Obrázek 28: Železo-chelatační aktivity lykorinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



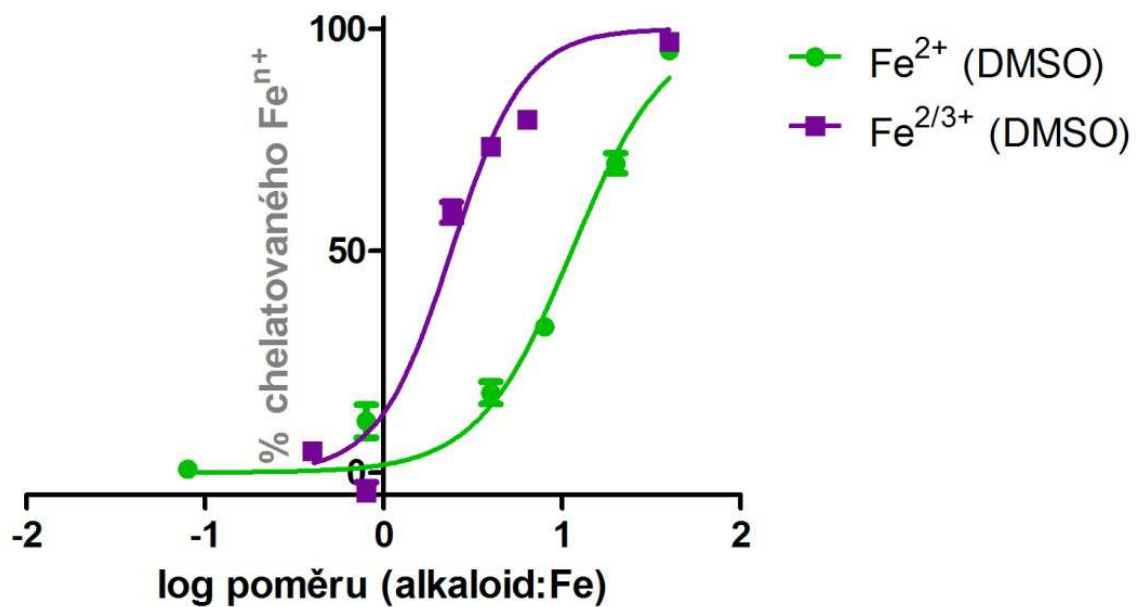
Obrázek 29: Železo-chelatační aktivity protopinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



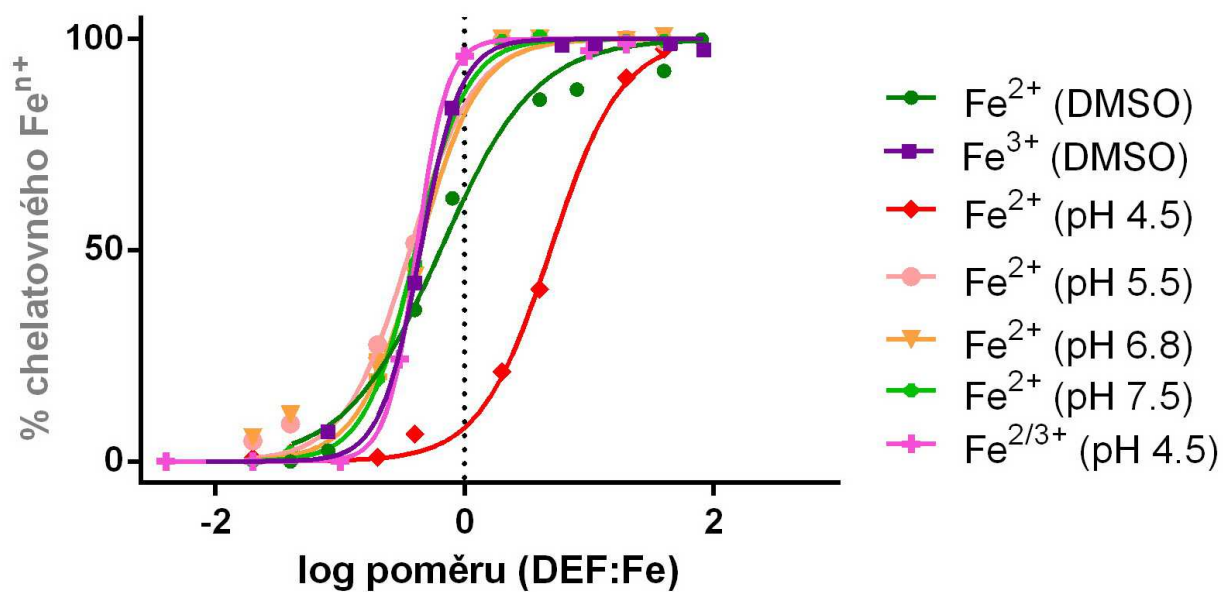
Obrázek 30: Železo-chelatační aktivity sinoakutinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



Obrázek 31: Železo-chelatační aktivity skulerinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



Obrázek 32: Železo-chelatační aktivity stylopinu v závislosti na poměru alkaloidu a železa



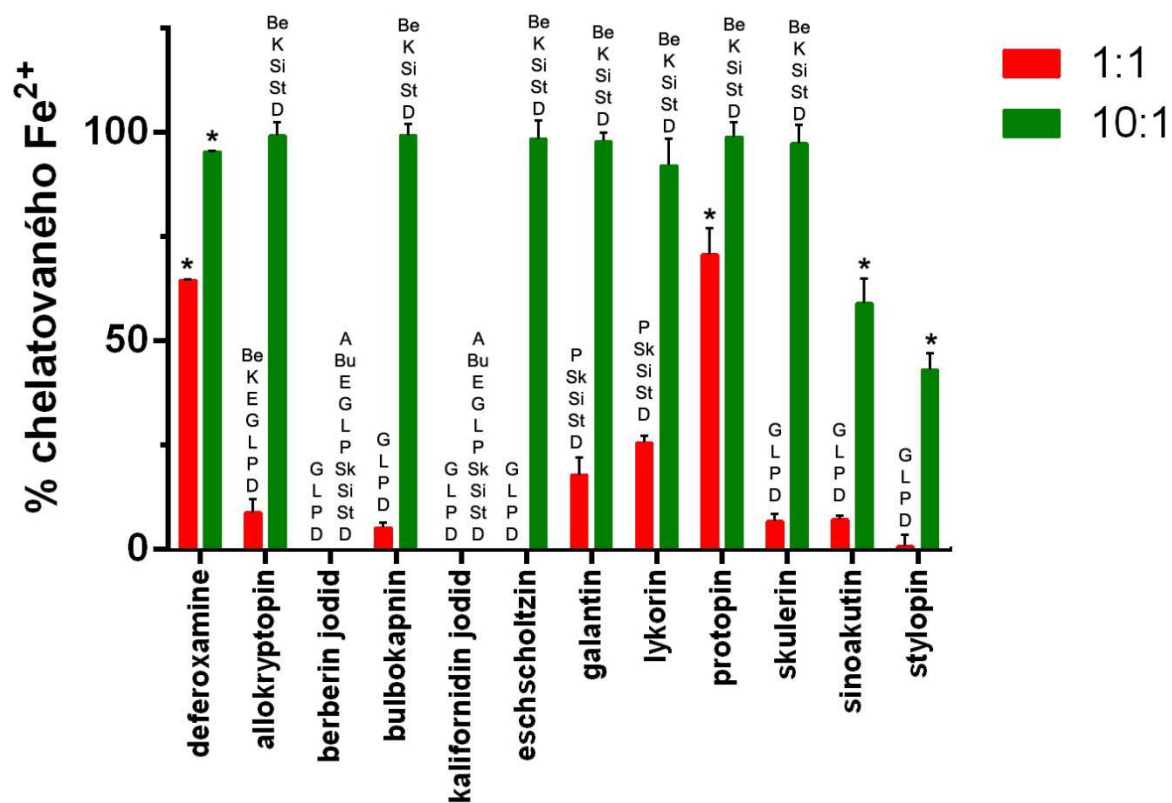
Obrázek 33: Železo-chelatační aktivity deferoxaminu v závislosti na poměru alkaloidu a železa

Tabulka 2: Množství chelatovaných železnatých iontů v poměru chelátor: Fe²⁺ 1:1 a 10:1 v procentech

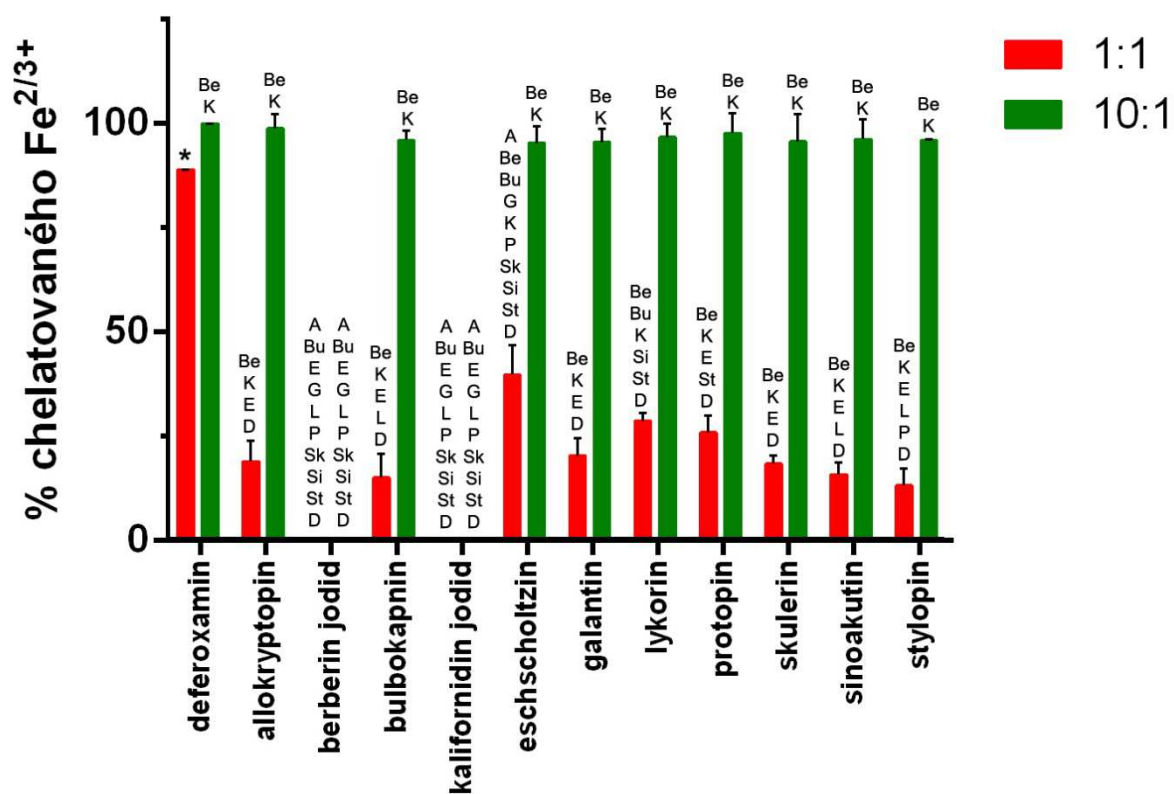
Fe²⁺				
chelátor	1:1		10:1	
	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
protopin	71,2	6,4	99,4	3,6
deferoxamin	65,1	0,1	95,9	0,1
lykorin	26,1	1,7	92,6	6,3
galantin	18,3	4,1	98,4	2,0
allokryptopin	9,3	3,2	99,7	3,3
sinoakutin	7,7	0,9	59,5	6,0
skulerin	7,2	1,7	97,9	4,4
bulbokapnin	5,7	1,1	99,7	2,7
stylopin	1,2	2,7	43,6	3,9
eschscholtzin	0,0	0,0	98,9	4,4
kalifornidin jodid	0,0	0,0	0,0	0,0
berberin jodid	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabulka 3: Množství chelatovaného železa v poměru chelátor: Fe^{2/3+} 1:1 a 10:1 v procentech

Fe^{2/3+}				
chelátor	1:1		10:1	
	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
deferoxamin	88,8	0,1	99,8	0,1
eschscholtzin	39,6	7,1	95,2	3,9
lykorin	28,5	1,9	96,6	3,2
protopin	25,8	3,9	97,6	4,6
galantin	20,2	4,1	95,4	3,2
allokryptopin	18,8	5,0	98,7	3,3
skulerin	18,3	1,9	95,6	6,5
sinoakutin	15,7	2,9	96,1	4,7
bulbokapnin	14,9	5,7	95,9	2,3
stylopin	13,1	3,9	95,8	0,3
berberin jodid	0,0	0,0	0,0	0,0
kalifornidin jodid	0,0	0,0	0,0	0,0



Obrázek 34: Procentuální srovnání účinnosti alkaloidů při chelataci železnatých kationtů. Statistická významnost $p < 0,001$, Symboly *: vs všechny látky, A: vs allokryptopin, Be: vs berberin jodid, Bu: vs bulbokapnin, K: vs kalifornidin jodid, E: vs eschscholtzin, G: vs galantin, L: vs lykorin, P: vs protopin, Sk: vs skulerin, Si: vs sinoakutin, St: vs stylopin, D: vs deferoxamin



Obrázek 35: Procentuální srovnání účinnosti alkaloidů při chelataci celkového železa. Statistická významnost $p < 0,001$, Symboly *: vs všechny látky, A: vs allokryptopin, Be: vs berberin jodid, Bu: vs bulbokapnin, K: vs kalifornidin jodid, E: vs eschscholtzin, G: vs galantin, L: vs lykorin, P: vs protopin, Sk: vs skulerin, Si: vs sinoakutin, St: vs stylopin, D: vs deferoxamin

7 Diskuze

Alkaloidy byly, až na pár výjimek, ještě do nedávné doby, co se týká farmaceutického využití, opomíjenou skupinou. Bylo na ně nahlíženo jako na skupinu s poměrně silnými toxickými účinky na organismus a tak byly ponechány poněkud stranou. I přes to že se v poslední době pozornost ke studiu jejich farmakognostické aktivity začala vracet, zatím neexistuje dostatečné množství publikovaných výsledků výzkumů pro jejich porovnání. V přírodě se alkaloidy vyskytují asi ve 4000 rostlinných druzích, což dává velký prostor pro studium jejich farmakognostické aktivity. Cílem této práce bylo stanovit železo-chelatační aktivitu vybraných zástupců ze skupiny isochinolinových alkaloidů. Pro porovnání účinnosti chelatace jsme zvolili klinicky používaný deferoxamin. Terapie deferoxaminem je časově i finančně náročná a navíc s sebou často nese nežádoucí účinky, z těchto důvodů se hledají látky v těchto ohledech přívětivější.

Pro stanovení chelatační aktivity vybraných alkaloidů a deferoxaminu byla použita metoda mikrotitrace a detekce provedena pomocí spektrofotometru. Jako indikátor byl použit ferozin, který tvoří s Fe^{2+} komplex vykazující výrazný extinkční koeficiente při 562 nm (56). Při této vlnové délce byl měřen komplex ferozinu se „zbylým“ Fe^{2+} , které nebylo navázáno do komplexu s chelátorem-alkaloidem. Lineárnost závislosti naměřené absorbance na koncentraci Fe^{2+} byla ověřena kalibrační křivkou (obr. 21) s vysokou hodnotou spolehlivosti ($R^2 = 0,998$). Ferozin tvoří komplex specificky pouze s Fe^{2+} ionty, proto pro stanovení chelatace celkového železa musely být před vlastním měřením nejprve Fe^{3+} ionty redukovány na Fe^{2+} pomocí redukčního činidla hydroxylaminu.

Porovnání výsledné aktivity alkaloidů bylo provedeno při dvou koncentracích a to při poměru chelátor- železnaté ionty 1:1 a chelátor- železnaté ionty 10:1.

Při chelataci Fe^{2+} iontů v poměru chelátor-železnaté ionty 1:1 (dále jen 1:1) byl nejaktivnější z alkaloidů protopin (71,2 %), dále deferoxamin (65,1%), lykorin (26,1 %) a galantin (18,3 %). Ostatní měřené alkaloidy (řazeno sestupně dle aktivity: allokryptopin, sinoakutin, skulerin, bulbokapnin, stylopin, eschscholtzin) nevykázaly výraznou aktivitu (< 10%), berberin jodid a kalifornidin jodid nechelatovaly železo vůbec.

Při poměru chelátor- železnaté ionty 10:1 (dále jen 10:1) byly hodnoty chelatace vysoké u více zástupců. Největší aktivitu vykázaly allokryptopin a bulbokapnin (99,7 %), následoval je protopin (99,4 %), eschscholtzin (98,9 %), galantin (98,4 %), skulerin

(97,9 %), teprve pak následoval deferoxamin (65,1 %). Malou aktivitu vykázal ještě lykorin (26,1 %), stylopin již pouze zanedbatelnou a berberin jodid a kalifornidin jodid žádnou aktivitu nevykázaly.

Při chelataci celkového železa byly výsledky jiné. Opět bylo měřeno pro poměr chelátor-celkové železo 1:1 (dále jen 1:1) a chelátor-celkové železo 10:1 (dále jen 10:1). V poměru 1:1 byl nejaktivnější deferoxamin (88,8 %), následovaly ho alkaloidy, jejichž aktivity byla výrazně nižší, eschscholtzin (39,6 %), lykorin (28,5 %), protopin (25,8 %), galantin (20,2 %), allokryptopin (18,8 %), sinoakutin (15,7 %). Bulbokapnin a stylopin měly nízkou aktivitu (<15 %) a berberin jodid a kalifornidin jodid žádnou aktivitu nevykázaly.

Při poměru koncentrací 10:1 byla naměřená aktivita všech aktivních alkaloidů vysoká, nejaktivnější byl ale opět deferoxamin (99,8 %), následoval ho allokryptopin (98,7 %), protopin (97,6 %), lykorin (96,6 %), sinoakutin (96,1 %), bulbokapnin (95,9 %), stylopin (95,8 %), skulerin (95,6 %), galantin (95,4 %) a eschscholtzin (95,2 %). Berberin jodid a kalifornidin jodid žádnou aktivitu nevykázaly.

Dále byla měřena aktivita při upraveném pH (acetátový pufr pro pH 4,5 a 5,5, HEPES pufr pro 6,8 a 7,5) pro železnaté ionty při hodnotách 5,5 6,8 a 7,5 a pro celkové železo při hodnotě 4,5. Při upraveném pH byl aktivní deferoxamin, z alkaloidů vykázal výraznější chelatační aktivitu jako jediný galantin a to při chelataci železnatých iontů, pro celkové železo žádná aktivita naměřena nebyla. Zanedbatelná aktivita byla zjištěna také u lykorinu, protopinu, skulerinu a allokryptopinu. Jedná se o tak nízkou chelataci, že ve výsledku nemá prakticky žádný význam. Pracovníci katedry anorganické a organické chemie se pokoušeli objasnit, co způsobuje nízkou až nulovou aktivitu alkaloidů při použití různých pufrů. K dispozici jim byl dán alkaloid protopin a používané pufrы. Tento problém se však bohužel prozatím objasnit nepodařilo.

Při chelataci železnatých iontů pro poměr 1:1 je tedy nejaktivnějším chelátorem protopin, následuje ho deferoxamin. Při poměru 10:1 je pořadí jiné, nejaktivnější jsou allokryptopin a bulbokapnin, těsně je následuje protopin.

Při chelataci celkového železa je nejaktivnější pro poměr 1:1 deferoxamin, alkaloidy vykázaly výrazně nižší aktivitu. Při poměru 10:1 nejlépe chelatoval deferoxamin, následoval ho allokryptopin a ostatní alkaloidy s vysokou aktivitou.

Bylo zjištěno, že při poměru 1:1, kdy je množství alkaloidu a železa stejné, byla chelatační aktivita alkaloidů poměrně nízká (např. allokryptopin 9,3%). Při desetinásobné koncentraci chelátoru k železu došlo k výraznému zvýšení aktivity alkaloidů (např. allokryptopin 99,7 %) a aktivita některých dosahovala téměř 100 % železa. Na základě těchto poznatků můžeme říci, že koncentrace alkaloidů ovlivňuje schopnost chelatovat železo kvantitativně i kvalitativně. Z toho vyplývá, že pokud se kromě inhibice AChE a BuChE bude klinicky využívat i chelatačních vlastností alkaloidů v léčbě Alzheimerovy choroby, bude lepší využívat koncentrace vyšší než je poměr 1:1. A nižší než je poměr 10:1, kdy chelatace některých alkaloidů dosahovala železo téměř ze 100 % ale nežádoucí účinky by byly výraznější. Z tohoto důvodu je potřeba změřit aktivitu při menším poměru než 10:1 a najít koncentraci, při které bude ještě dostatečně vysoká chelatační aktivita alkaloidu a zároveň nežádoucí účinky nebudou vyšší než u klinicky podávaného deferoxaminu. Aktivita chelátorů se mění při změně koncentrace, při dané koncentraci tedy bude nutné najít nejaktivnější chelátor. Dále je potřeba prozkoumat inhibiční aktivitu na AChE a BuChE, která je pro klinický účinek u Alzheimerovy choroby zásadní.

Ze vztahu mezi strukturou a aktivitou vyplývá, že alkaloidy obsahující kvartérní dusík - berberin jodid a kalifornidin jodid žádnou chelatační aktivitu nevykazují. Pro zachování schopnosti chelatace musí být v alkaloidu obsažený terciární dusík. Dále aktivitu zvyšuje hydrogenace kruhu A isochinolinu. Nejaktivnější byly alkaloidy s rozpojeným kruhem A isochinolinu (protopin, allokryptopin). Další zvýšení aktivity bylo pozorováno při navázání ketonické skupiny na C6 (protopin, allokryptopin). Uzavřením skupin obsahujících kyslík do heterocyklů dochází k mírnému poklesu aktivity. Z toho vyplývá, že MeOH a OH skupina obsažené v molekule alkaloidu chelataci mírně podporují.

Porovnání vztahu mezi strukturou a účinkem je při takto malém souboru alkaloidů velmi obtížné a v současné době neexistují publikovaná data vhodná pro porovnání výsledků. Proto se závěry závislosti účinku na struktuře uvedené v této diplomové práci nemusí shodovat s později vzniklými poznatky. Závěry mohou být upraveny v závislosti na rozšíření souboru alkaloidů nebo porovnáním s nově publikovanými daty.

8 Závěr

V diplomové práci byla popsána železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů isochinolinového typu (allokryptopin, berberin, bulbokapnin, eschscholtzin, galantin, lykordin, kalifornidin, protopin, sinoakutin, skulerin, stylopin). Výsledky byly následně porovnány s aktivitou deferoxaminu, který byl vybrán jako standard. Bylo zjištěno, že koncentrace alkaloidu kvantitativně i kvalitativně ovlivňuje chelataci železa. Nejaktivnějším chelátorem železnatých iontů při poměru chelátor: Fe^{2+} 1:1 byl protopin s 71,2 % chelatovaných iontů. Při desetinásobné koncentraci chelátoru k železnatým iontům byly nejaktivnější bulbokapnin s allokryptopinem s 99,7 % chelatovaného železa. Při obou měřeních vykázaly alkaloidy vyšší chelatační aktivitu než klinicky používaný deferoxamin. Při chelataci celkového železa při obou poměrech nejlépe chelatoval deferoxamin. Pro poměr chelátor k celkovému železu 1:1 byla jeho aktivita výrazně vyšší než u alkaloidů, ale při poměru 10:1 byla aktivita alkaloidů a deferoxaminu velmi blízká. Byla také měřena aktivita při upraveném pH a to 4,5, 5,5, 6,8, a 7,5. Jako jediný alkaloid prokázal při upraveném pH aktivitu galantin, deferoxamin byl při upraveném pH také aktivní.

Zkoušené vlastnosti alkaloidů nemohly být porovnány s jinými publikovanými informacemi, protože v době vzniku práce nebyly žádné takové poznatky týkající se vybraných alkaloidů zveřejněny.

9 Seznam zkratek

- 5-HT- 5-hydroxytryptofan(serotonin)
- AD- Alzheimerova demence
- ACh- acetylcholin
- AChE- acetylcholin esteráza
- COX-2- cyklooxygenáza 2
- D1- dopaminergní receptor typ 1
- D2- dopaminergní receptor typ 2
- DFX- deferoxamin
- DMSO- dimethylsulfoxid
- DNA- deoxynukleová kyselina
- EDTA- edetan disodný
- GABA_A rec.- receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typ A
- GIT- gastrointestinální trakt
- HA- hydroxylamin
- HEB- hematoencefalická bariéra
- iNOS- indukibilní-NO- syntéza
- IRDs- železo regulační proteiny
- LOX- lipoxigenáza
- NMDA receptor- N-methyl-D-aspartát receptor
- PGE2- prostaglandin 2
- RAR- retinoid acid receptors
- ROS- reaktivní formy kyslíku

10 Citovaná literatura

1. **Koolman J., Röhms K.** *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. Praha : Grada Publishing a.s., 2012. stránky 388-390. ISBN: 978-80-247-2977-0.
2. **Perry G., Taddeo M. A., Petersen R. B., Castellani R. J., Harris P. L. R., Siedlak S. L., Cash A.D., Liu Q., Nunomura A., Atwood C. S., Smith M. A.** Adventiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals*. 16, 2003, Sv. 1, stránky 77-81.
3. **Tilšer I.** *Léčba demencí (Kognitiva, antidementiva)*. Hradec Králové : materiály Katedry farmakologie, Farmaceutická fakulta, UK, 2010.
4. **Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.** *Biochemie pro studující medicíny. 2 Díl. 1. Vydání*. Praha: Karolinum : Karolinum, 2006. ISBN 80-246-0850-2.
5. **Silbernagl S., Lang F.** *Atlas patofyziologie*. Praha : Grada Publishing a.s., 2012. stránky 370-371. ISBN 80-247-0630-X.
6. **Horák J., kolektiv.** *Hemochromatóza*. Praha : Grada Publishing a.s, 2010. stránky 43-48. ISBN 978-80-247-6385-9.
7. **Castellani R. J., Moreira P. I., Liu G., Dobson J., Perry G., Smith P. A., Zhu X.** Iron: The Redox-active Center of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Neurochemical Research*. 32, 2007, Sv. 10, stránky 1640-1645.
8. **Aouad F., Florence A., Zhang Y., Collins F., Henry C., Ward R.J., Crichton.,** Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica chimica acta*. 339, 2002.
9. **Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ha V.** *Imunitní systém*. Praha : Grada Publishing a.s, 2005. stránky 370-380. ISBN 80-247-1196-6.
10. **Mladěnka P., Hrdina R., Hübl M., Šimůnek T.** The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radical Research*. 40, 2006, Sv. 3, stránky 263-272.
11. **Olivieri N.F., Brittenham G.M.,** Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood*. 89, 1997, stránky 739-761.

12. **Thies W., Bleiler L., Alzheimer's Association.** Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dementia*. 7, 2011, Sv. 2, stránky 208-244.
13. **Pidrmán V.** *Demence*. Praha : Grada Publishing a.s, 2007. stránky 34-41. ISBN 978-80-247-6672-0.
14. **Mačák J., Mačáková J., Dvořáčková J.** *Patologie - 2., doplněné vydání*. Praha : Grada Publishing a.s, 2012. stránky 300-301. ISBN 978-80-247-3530-6.
15. **Rottkamp C. A., Raina A. K., Zhu X., Gaier E., Bush A. I., Atwood C. S., Chevion M., Perry G., Smith M. A.** Redox-active iron mediates amyloid- β toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 30, 2001, Sv. 4, stránky 447-450.
16. **Adersen A., Kjøbye A., Dall O., Jäjer A. K.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 2007, stránky 179-182.
17. **Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural product communications*. 2010, Sv. 5, 11, stránky 1751-1754.
18. **Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Natural product communications*. 2010, Sv. 5, 7, stránky 1035-1038.
19. **Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Natural product communications*. 6, 2011, Sv. 5, stránky 607-610.
20. **Ehrmann J., Hůlek P. a kolektiv.** *Hepatologie*. Praha : Grada Publishing a.s, 2010. stránky 340-342. ISBN 978-80-247-3118-6.
21. **Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.** *Farmakologie a toxikologie-překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Praha : Grada Publishing a.s, 2004. stránky 213-214. 80-247-0836-1.

22. **Martínková J., Mičuda S., Čermáková J.** *Vybrané kapitoly z klinické farmakologie pro bakalářské studium: Terapie anémií*. Hradec Králové : Ustav farmakologie LF UK, 2001.
23. **Šeclová S.** *Klinické použití krve, 1. vyd.* Praha : Grada Publishing a.s, 2002. stránky 106-108. ISBN 80-247-0268-1.
24. **Lüllmann H., Mohr K., Hein L.** *Barevný atlas farmakologie - Překlad 4. anglického, zcela přepracovaného a rozšířeného vydání*. Praha : Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3908-3.
25. **Brent J.** *Critical Care Toxicology: Diagnosis And Management Of The Critically Poisoned Patient- Deferoxamine*. Philadelphia : Elsevier, 2005. ISBN: 0-8151-4387-7.
26. Deferoxamine Mesylate 252750 . Merck milipore. [Online] http://www.merckmillipore.com/czech-republic/life-science-research/deferoxamine-mesylate/EMD_BIO-252750/p_RQKb.s1L__QAAAEWhmEfVhTm?PortalCatalogID=merck4biosciences.
27. **Brosse A.** *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology V43: Chemistry and Pharmacology*. San Diego : Academic Press, 1993. stránky 71-75. ISBN 0-12-469543-4.
28. **Šmídová J., Habermann V.** *Alkaloidy : malé laboratorní praktikum, 1. vyd.* Praha : Nakladatelství Karolinum, 2001. str. 5. ISBN 80-246-0206-7.
29. **Rackova L., Oblozinsky M., Kostalova D., Kettmann V., Bezakova L.** Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of Mahonia aquifolium extract and isoquinoline alkaloids. *Journal of Inflammation* 2007, Sv. 4, 15.
30. **Kabashima H., Miura N., Shimizu M., Shinoda W., Wang X., Wang Z., Takahashi S., Harada T., Maruyama H., Tashiro S., Ichiyanagi T., Hasegawa J.** Preventive impact of alkaloids with anti-cancer effect extracted from natural herb and the derivatives. 2010 [online] http://www.webmedcentral.com/article_view/519
31. **Jung H. A., Min B. S., Yokozawa T., Lee J. H., Kim Y. S., Choi J. S.** Anti-Alzheimer and Antioxidant Activities of Coptidis Rhizoma Alkaloids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 32, 2007, 8, stránky 1433-1438.

32. **Opletal L.** *Alkaloidy*. Hradec Králové : Fakulta farmakognozie Farmaceutické fakulty UK, 2004.
33. **Özçelik B., Kartal M., Orhan I.** Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology, Informa Healthcare USA*. 49, 2011, Sv. 4.
34. **Vrba J., Vrublova E., Modriansky M., Ulrichova J.** Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicology Letters*. 203, 2011, stránky 135-141.
35. **Morteza-Semnani K., Saeedi M., Hamidian M., Vafamehr H., Dehpour A. R.** Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 80, 2002, stránky 181-186.
36. **Abu-Ghalyun Y., Masalmeh A., Al-Khalil S.** Effects of Allocryptopine, an Alkaloid Isolated from *Glaucium arabicum* on Rat Isolated Ileum and Urinary Bladder. *Elsevier Science Inc.* 1997.
37. **Cabo J., Cabo M.M., Cabo M.P., Cruz T., Ruiz C.** *Glaucium flavum* Crantz. IV. Antimicrobial activity. *Microbios Inc.* 56, 1988, Sv. 177-80.
38. **Morteza-Semnania K., Amin Gh., Shidfar M. R., Hadizadeh H., Shafiee A.** Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Elsevier. Fitoterapia*, 2003, Sv. 74, 493–496.
39. **Wang K., Luo Ch., Liu H., Xu J., Sun W., Zhou L.** Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. *African Journal of Agricultural Research*. 7, 2012, Sv. 14.
40. **Millspaugh Ch.F.** *American Medicinal Plants: An Illustrated and Descriptive Guide to Plants Indigenous to and Naturalized in the United States Which Are Used in Medicine*. Mineola, New York : Courier Dover Publications, 1892. ISBN 0486230341.
41. **Hung T. M., Na M., Tien Dat N., Ngoc T. M., Youn U., Kim H. J., Min B. S., Lee J. P., Bae K.** Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 119, 2008, 1.

42. **Gao K., Chen J., Zhao H., Wu H., Liu B., Wang W.** Distribution, Structures and Pharmacological Activities of Aporphine Alkaloids in various plant families. *Topclass Journal of Herbal Medicine*. Vol. 1(1), 2012, Sv. Pp. 001-028.
43. **Giebelmann R., Logemann E., Arndt T.** Kulturgeschichtliches zu den Mohnengewächsen (Papaveraceae). *Toxichem krimtech*. 79, 2012, Sv. 2.
44. **Gafner S., Dietz B. M., McPhail K. L. ...** Alkaloids from *Eschscholtzia californica* and their capacity to inhibit binding of [3H]8-Hydroxy-2-(di- N-propylamino)tetralin to 5-HTA1 receptors in vitro. *American Society of Pharmacognosy*. 69, 2006, Sv. 432-5.
45. **Bednaříková L.** Biologicky aktivní metabolity rostlin. 4. Alkaloidy *Eschscholtzia californica* CHAM. a jejich biologická aktivita. *Repozitář závěrečných prací UK*. [Online] 2011.
<https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSIONCCF1BD95BE10965FD509C2E8CAA9AFD9/zzp/detail/80833/?lang=cs&file=120042762>.
46. The Firefly forest. *California Poppies at Picacho Peak State Park*. [Online] <http://fireflyforest.net/firefly/2008/02/27/california-poppies-at-picacho-peak-state-park/>.
47. **Rey J. P., Levesque J., Pousset J. L.** Analytical and quantitative studies of californin and protopin in aerial part extracts of *Eschscholtzia californica* Cham. with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 587, 1991, Sv. 2, stránky 314-317.
48. **Liscombe D. K., Ziegler J., Schmidt J., Ammer Ch., Facchini P. J.** Targeted metabolite and transcript profiling for elucidating enzyme function: isolation of novel N-methyltransferases from three benzyloquinoline alkaloid-producing species. *The Plant Journal*. 60, 2009, Sv. 4, stránky 723-743.
49. **Kornienko A., Alexander E.** Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*. 8, 2009, Sv. 449–459.
50. **Lamoral-Theys D., Decaestecker C., Mathieu V., Dubois J., Kornienko A., Kiss R., Evidente A., Pottier L.** Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 10, 2010, Sv. 41-50.

51. **Zhong J.** Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*. 28, 2011, Sv. 1126.
52. **Muemmler S., Rueffer M., Nagakura N., Zenk M. H.** S-adenosyl-L-methionine: (S)-scoulerine 9-O-methyltransferase, a highly stereo- and regio-specific enzyme in tetrahydroprotoberberine biosynthesis. *Plant Cell Reports*. 4, 1985, Sv. 1, stránky 36-39.
53. **Jianfeng L., Guozhang J., Jingshan S., Ruyun J.** I-chloroscoulerine mesylate: antipsychotic dopamine D1 agonist/D2 antagonist. *Drugs of the Future*. 31, 2006, Sv. 5, stránky 379-384.
54. **Bao G.H., Qin G.H., Wang R., Tang X.C.** Morphinane alkaloids with cell protective effects from *Sinomenium acutum*. *Journal of natural products*. 68, 2005, Sv. 7, stránky 1128-1130.
55. **Jang S.I., Kim B. H., Lee W.Y. a kolektiv.** Stylophine from *Chelidonium majus* inhibits LPS- induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research*. 27, 2004, Sv. 9, stránky 923-929.
56. **Stookey L.L.** Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. 42, 1970, stránky 799-781.

11 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Tereza Rudolfová

Školitel: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů I. (2012-2013)

Železo patří mezi nezbytné stopové prvky organismu, kde zastává mnoho důležitých funkcí. Poruchy metabolismu železa se projevují jeho nedostatkem (anémie) nebo nadbytkem (hematochromatóza). Při nadbytku dochází k železem indukované tvorbě volných radikálů. Toto bylo pozorováno u nemocných s Alzheimerovou chorobou.

Nadbytek železa je upravován pomocí chelátorů (např.: deferoxamin). Jeho terapie pomalou infuzí je časově a finančně náročná. Z tohoto důvodu se hledají nové látky pro podání per os.

Alkaloidy jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Ve velkých dávkách působí na organismus toxicky. V nízkých koncentracích se dají některé jejich vlastností využít k léčbě.

Tato práce byla zaměřena na výzkum chelatační aktivity isochinolinových alkaloidů- allokryptopinu, berberinu, bulbokapninu, eschscholtzinu, galantinu, lykorinu, kalifornidinu, protopinu, sinoakutinu, skulerinu a stylopinu. Jako referenční látka byl pro srovnání použit deferoxamin. Chelatace byla měřena pro Fe^{2+} ionty a pro celkové železo, kde byl jako redukční činidlo použit hydroxylamin. Byla také měřena chelatace při upraveném pH na hodnoty 4,5, 5,5, 6,8 a 7,5. Jako indikátor Fe^{2+} iontů byl použit ferozin a aktivita alkaloidů byla měřena pomocí spektrofotometru.

Výsledná aktivita alkaloidů byla porovnána při dvou koncentracích. Při poměru chelátor-železnaté ionty 1:1 byl nejaktivnější protopin poté deferoxamin a lykorin. Při poměru 10:1 byly nejaktivnější allokryptopin a bulbokapnin poté protopin. Aktivita alkaloidů k celkovému železu se liší. Při poměru chelátor-celkové železo 1:1 byl nejaktivnější deferoxamin poté eschscholtzin a lykorin. Při poměru 10:1 nejvíce chelatoval deferoxamin, allokryptopin a pak následovaly s velmi blízkou aktivitou ostatní alkaloidy kromě berberinu a kalifornidinu, které ani u jednoho měření žádnou chelataci nevykázaly. Při upraveném pH vykázal měřitelnou aktivitu pouze galantin.

Ze vztahu mezi strukturou a aktivitou vyplývá, že alkaloidy obsahující kvartérní dusík nemají schopnost chelatace. Aktivitu zvyšuje hydrogenace kruhu A isochinolinu. Nejaktivnější byly s rozpojeným kruhem A isochinolinu a na C6 navázanou ketonickou skupinu. OH skupina chelataci mírně zvyšuje. Uzavřením kyslíku do heterocyklu se aktivita sníží.

12 Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical botanic and ecology

Candidate: Tereza Rudolfová

Supervisor: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Iron-chelating activity of selected alkaloids I. (2012-2013)

Iron belongs among the essential trace elements in the human body, where takes many important functions. Metabolic disorder of iron occurs as iron deficiency (anemia) or its abundance (hematochromatosis). Production of free radicals is induced while the level of iron is increased. This has been observed in patients with Alzheimer's disease.

Abundance of iron is treated by chelating agents (f.e. deferoxamine). Treatment takes place by slow infusion which is time-consuming and expensive. These are reasons of looking for new substances administrated orally.

Alkaloids are products of secondary metabolism of plants. Big doses are toxic for body. Some of their properties can be used for treatment in low concentration. This work focuses on chelation activity of certain isoquinoline alkaloids (allocryptopine, berberine, bulbocapnine, eschscholtzine, galantine, lykorine, californidine, protopine, sinoacutine, sculerine and stylopine). Deferoxamine has been used as a standard. Chelation of Fe^{2+} ions and total iron, where hydroxylamine has been used as reduction agent has been measured by spectrophotometer. It has been also measured with modified pH (4.5, 5.5, 6.8 and 7.5). Fe^{2+} ions indicator was ferrozine.

Final activity has been compared for two concentrations. In the ratio chelator- Fe^{2+} ions of one to one protopine followed by deferoxamine and lykorine were the most active. In the ratio 10:1 allocryptopine and bulbocapnine followed by protopine were the most active. Activity of alkaloids for total iron was different. In the ratio chelating agent- total iron 1:1 deferoxamine followed by eschscholtzine and lykorine were the most active. In the ratio 10:1 deferoxamine and allocryptopine followed by other alkaloids apart from berberine and californidine which didn't prove activity in any test were the most active. In changed pH conditions galanthine was the only active.

From the structure-activity relationship results alkaloids that contain quaternary nitrogen have no chelation activity. Positive effect on activity was shown by hydrogenation of A

circle of isoquinoline, A circle opening and ketonic group bond on C6. Hydroxy group slightly increase chelation. Heterocyclic bond oxygen lower chelation activity.